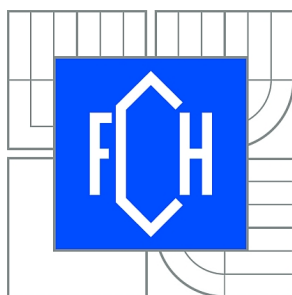




**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA CHEMICKÁ**

**CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU**

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

# STUDIUM INTERAKCÍ HYALURONAN-TENZIDY DIALYZAČNÍ TECHNIKOU

DIALYSIS STUDY OF HYALURONAN-SURFACTANT INTERACTIONS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. MICHAELA ŠEJNOHOVÁ**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.**

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0849/2013</b>	Akademický rok: <b>2013/2014</b>
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	<b>Bc. Michaela Šejnohová</b>	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	<b>prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Studium interakcí hyaluronan-tenzidy dialyzační technikou

### Zadání diplomové práce:

1. Provést rešerši na téma studium interakcí polyelektrolytů s tenzidy dialyzační metodou.
2. Nalézt a ověřit vhodnou analytickou metodu pro stanovení koncentrace tenzidu CTAB.
3. Navrhnout a provést dialyzační experimenty studující interakce mezi hyaluronanem a CTAB.
4. Vyhodnotit získaná data, posoudit vazbu tenzidu na hyaluronan, zamyslet se nad významem výsledků pro přípravu nosičů biologicky aktivních látek.

### Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Michaela Šejnohová  
Student(ka)

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

V této diplomové práci byly studovány interakce mezi polyelektrolytem (hyaluronanem sodným) a kationaktivním tenzidem (CTAB). Experimenty byly provedeny ve vodném prostředí a v prostředí fyziologické iontové síly ( $0,15\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl). Stanovení koncentrace tenzidu v roztocích bylo založeno na tvorbě barevných komplexů CTAB s kyselinou pikrovou v chloroformu, které byly proměřeny pomocí UV-VIS spektroskopie. Stabilita systému CTAB+HyA byla prověřena pomocí dialyzační metody. Výsledky ukázaly, že přítomnost HyA v roztoku, bez ohledu na použité prostředí, snižuje množství volných molekul CTAB, které mohou být ve vzorku stanoveny. Tím byla dokázána interakce hyaluronan-tenzid a větší afinita CTAB k HyA než ke kyselině pikrové. Dialyzační metodou pak bylo stanoveno, že v membráně zůstane určité množství CTAB navázané na hyaluronan, i když dojde po 120 hodinách dialýzy k vyrovnání koncentrací CTAB retentátu a permeátu. Systém by tedy díky této stabilitě mohl být vhodný pro přípravu cílených nosičů biologicky aktivních látek.

## **ABSTRACT**

This diploma thesis is concentrated on the interactions between polyelectrolyte (hyaluronan) and cationic surfactant (CTAB). The experiments were performed in an aqueous solution and in an environment of physiological ionic strength ( $0,15\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl). The determination of the surfactant concentration in solutions was based on the formation of colored complexes of CTAB and picric acid in chloroform. The concentrations of surfactant were measured by UV-VIS spectroscopy. The stability of CTAB+HyA was examined by a dialysis method. The results showed that, regardless of the environment, the presence of HyA in solution reduces the number of free molecules of CTAB which can be determined in the sample. It has been proved that there is an interaction between HyA and surfactant and that CTAB has greater affinity for HyA than for the picric acid. The stability of CTAB+HyA was determined by dialysis of 120 hours. After that time, the concentrations of the retentate and permeate were settled. The results showed that in the membrane remains a certain amount of CTAB bounded to hyaluronan. The system can be suitable for the preparation of targeted carriers of biologically active substances.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hyaluronan, tenzid, interakce, kyselina pikrová, UV-VIS spektroskopie, dialýza

## **KEYWORDS**

hyaluronan, surfactant, interaction, picric acid, UV-VIS spectroscopy, dialysis

ŠEJNOHOVÁ, M. *Studium interakcí hyaluronan-tenzidy dialyzační technikou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 64 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citovala správně a úplně. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. a konzultantovi Ing. Filipu Mravcovi Ph.D. za ochotu, laskavost a odborné a cenné rady, které mi velice usnadnily vypracování této diplomové práce.*

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Kyselina hyaluronová .....	8
2.1.1	Chemické a fyzikální vlastnosti .....	8
2.1.2	Struktura v roztoku .....	9
2.1.3	Polymerní struktura .....	9
2.1.4	Výskyt.....	10
2.1.5	Výroba .....	10
2.1.6	Biologické funkce .....	10
2.2	Asociativní (micelární) koloidy .....	10
2.2.1	Molekulární struktura micelárních koloidů .....	11
2.2.2	Povaha tenzidů.....	11
2.2.3	Kritická micelární koncentrace .....	13
2.2.4	Solubilizace.....	17
2.2.5	Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek .....	17
2.2.6	Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů.....	18
2.3	UV-VIS spektroskopie.....	19
2.3.1	Spektrální oblasti .....	19
2.3.2	Přechody dle kvantové chemie .....	20
2.3.3	Typy elektronových přechodů .....	20
2.3.4	Využití .....	22
2.3.5	Kyselina pikrová.....	22
2.4	Membránové separační metody .....	23
2.4.1	Princip.....	23
2.4.2	Dialýza .....	23
2.4.3	Typy membrán.....	25
2.4.4	Vlastnosti membrán .....	26
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	27
4	MATERIÁLY A METODY .....	30
4.1	Použité chemikálie .....	30
4.2	Příprava zásobních roztoků.....	30
4.2.1	Zásobní roztok hyaluronanu .....	30
4.2.2	Zásobní roztok CTAB.....	30

4.2.3	Zásobní roztok $0,15\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl .....	31
4.2.4	Zásobní roztok 0,01% kyseliny pikrové v chloroformu .....	31
4.3	Příprava vzorků .....	31
4.3.1	Příprava vzorků CTAB ve vodě a v NaCl .....	31
4.3.2	Příprava vzorků CTAB+ HyA ve vodě a v NaCl .....	31
4.3.3	Příprava roztoků CTAB pro ověření metodiky .....	31
4.3.4	Příprava vzorků CTAB a CTAB+HyA ve vodě a v NaCl pro dialýzu.....	31
4.4	Modifikovaná Mahrousova metoda přípravy vzorků pro měření .....	32
4.4.1	Příprava vzorků pro ověření vlivu délky a způsobu třepání vzorků .....	32
4.4.2	Příprava vzorků pro ověření vlivu koncentrace kyseliny pikrové .....	32
4.4.3	Příprava vzorků pro ověření vlivu přesného objemu kyseliny pikrové .....	32
4.5	Dialýza .....	32
4.6	Měření .....	33
4.7	Statistika.....	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	35
5.1	Kalibrační křivky .....	35
5.1.1	Kalibrační křivky .....	35
5.2	Ověření metodiky.....	37
5.2.1	Vliv délky a způsobu třepání vzorků .....	37
5.2.2	Vliv koncentrace kyseliny pikrové .....	38
5.2.3	Vliv přesného objemu kyseliny pikrové .....	39
5.2.4	Optimalizovaný postup .....	40
5.3	Vliv přítomnosti hyaluronanu .....	40
5.4	Interakce CTAB s hyaluronanem o různých koncentracích .....	43
5.5	Dialýza .....	46
5.5.1	Vodné prostředí .....	47
5.5.2	Prostředí fyziologické iontové síly .....	52
6	ZÁVĚR.....	57
7	LITERATURA.....	59
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	63
9	PŘÍLOHY.....	64
9.1	Podrobný postup stanovení CTAB .....	64
9.1.1	Příprava zásobního roztoku 0,01% kyseliny pikrové v chloroformu .....	64
9.1.2	Převedení vzorků do chloroformu .....	64

# 1 ÚVOD

V dnešní době je v oblasti medicíny a chemie jedním z nejprobíranějších témat výzkum cílených nosičů léčiv, především léčiv zhoubného nádorového bujení. Mnoho vědeckých center a pracovníků na celém světě se snaží najít systém, který by byl účinný v boji proti rakovině. Tato nemoc dnes není vůbec neobvyklá a postihuje osoby stále mladšího věku. Spolu s kardiovaskulárními chorobami je jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve světě i v České republice. Běžně používaná léčiva jsou již značně nevyhovující. V lidském těle se dostávají i do míst, která nádorem postižená nejsou, ve vlastním prostředí organismu mohou být velmi špatně rozpustná a celkově hrozí chronická toxicita organismu. Cílené nosiče léčiv by měly interagovat se specifickým místem účinku, měly by být biokompatibilní a biodegradabilní a účinná látka by se z nich měla uvolňovat postupně, aby její koncentrace byla pořád přibližně stejná.

Průzkum interakcí hyaluronanu s dalšími látkami by měl přispět právě k vývoji cílených nosičů léčiv. Hyaluronan je v této době velmi zkoumanou a využívanou látkou. Tato substance již byla nespočetněkrát aplikována v oblasti medicíny, farmacie, ale i kosmetiky. A to díky schopnostem jako jsou hydratace pokožky, lubrikace, hojení ran a popálenin. Kyselina hyaluronová je tělu vlastní látka a nachází se například v očním sklivci, kůži a svalech, ale také je receptory přitahována k nádorovým buňkám, které vyživuje. A to je hlavní myšlenkou výzkumu cílených nosičů léčiv, kde by základ mohl tvořit právě hyaluronan.

Tato diplomová práce je zaměřena na studium interakcí a agregačního chování v roztocích systému polyelektrolyt-tenzid. Jako polyelektrolyt byl zvolen nízkomolekulární hyaluronan, jako tenzid byl vybrán cetyltrimethylamonium bromid (CTAB). Agregační chování systému bylo zkoumáno pomocí rovnovážné dialýzy. Jako činidlo stanovení přítomnosti CTAB byla využita kyselina pikrová, jejíž koncentrace v roztoku byla určena UV-VIS spektroskopií.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část diplomové práce je složena ze čtyř hlavních témat. První je zmíněna kyselina hyaluronová jakožto významná látka, která je hlavním objektem výzkumu této práce. Dále je uvedena kapitola o asociativních koloidech, neboli systémech, které jsou důležitou možností přípravy cílených nosičů léčiv špatně rozpustných ve vodě. Další navazující částí je UV-VIS spektroskopie, kde se jedná o metodu, kterou jsou v této práci připravované systémy kyseliny hyaluronové a tenzidu studovány. Teoretická část končí kapitolou o membránových separačních metodách a především dialýze. Touto metodou mají být prozkoumány interakce připravovaných systémů a určena jejich stabilita.

### 2.1 Kyselina hyaluronová

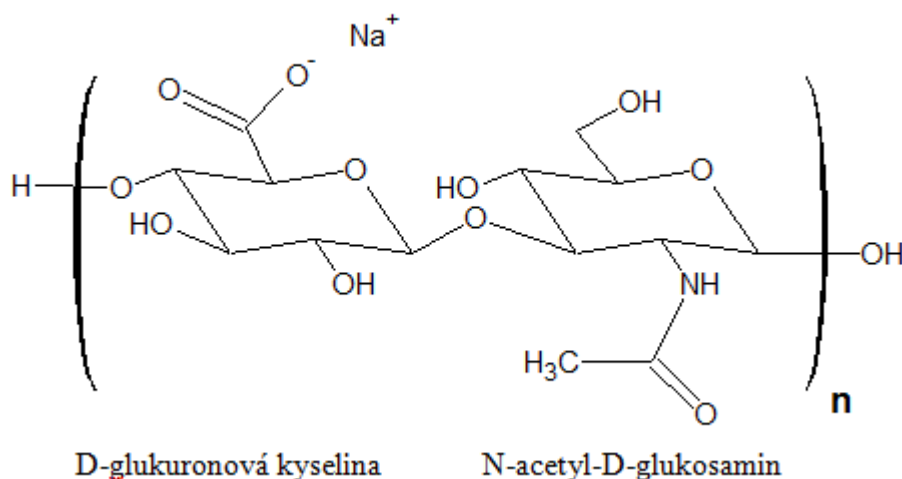
Kyselinu hyaluronovou objevil Karl Meyer se svým kolegou Johnem Palmerem. Neznámou chemickou látku skládající se ze dvou sacharidových jednotek izolovali z kravího očního sklivce. Následně byl získán hyaluronan ve vysoké čistotě a s vysokou molekulovou hmotností z pupeční šňůry a kohoutích hřebínků. Poprvé byla představena kyselina, která se za fyziologických podmínek chová jako sůl (hyaluronan sodný). Přesná chemická struktura byla stanovena v padesátých letech 20. století a její název byl odvozen ze slova „hyalos“ (řecky sklo) a kyseliny uronové. Ke komerčním účelům byla HyA využita Endrem Balazsem v roce 1942, který pomocí ní nahradil vaječný bílek v pekařských výrobcích, a následně byla poprvé aplikována při operaci očí. Dnes je kyselina hyaluronová jednou z nejzajímavějších a nejvíce zkoumaných přírodních látek [1], [2].

#### 2.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Kyselina hyaluronová (HA) je přírodní polysacharid, takzvaný glykosaminoglykan, skládající se z opakujících se disacharidových jednotek. V lineárním polymerním řetězci se střídají molekuly kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu (obr. 1). Jednotlivé molekuly jsou střídavě spojeny  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 glykosidickými vazbami stabilizovanými vodíkovými můstky. Oba cukry jsou připojené na glukózu, která v konfiguraci beta umožní, aby všechny objemné skupiny (hydroxyly, karboxylové kyseliny a anomerní uhlíky na připojeném cukru) zaujaly stericky výhodnou ekvatoriální polohu. Malé vodíkové atomy jsou pak v méně stericky výhodné axiální poloze. Toto uspořádání zajistí vysokou energetickou stabilitu [3].

Molekula hyaluronanu může být tvořena až několika tisíci sacharidových jednotek a dosahuje tak velmi vysoké molekulové hmotnosti. Hyaluronan může být oligomerem, kdy se molekula skládá pouze z několika disacharidových jednotek, častěji se však vyskytuje ve formě polymeru s obsahem 10 000 a více disacharidových jednotek. Jedna jednotka odpovídá molekulové hmotnosti přibližně  $400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a celková molekulová hmotnost polymerů se pak pohybuje okolo 4 milionů  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (4000 kDa) [3].





Obr. 1: Strukturní vzorec molekuly hyaluronanu

### 2.1.2 Struktura v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je struktura řetězce hyaluronanu dána kombinací chemické struktury disacharidu, vodíkovými můstky a interakcemi molekuly s rozpouštědlem. Hydrofobní nepolární oblasti molekuly jsou tvořeny axiálními vodíkovými atomy a hydrofilní polární část je dána ekvatoriální stranou řetězce. Každá disacharidová jednotka je vůči následující jednotce otočena o  $180^\circ$ . Dvě jednotky tak dávají otočení o  $360^\circ$  a struktura řetězce získává tvar takzvané zakroucené stuhy („two fold helix“).

Roztoky hyaluronanu mají neobvyklé reologické a lubrikační vlastnosti a jsou mimořádně hydrofilní. V roztoku zaujme polymerní řetězec hyaluronanu formu náhodné spirály. Toto uspořádání zajišťuje pevnost.

Již při poměrně nízkých koncentracích jsou řetězce hyaluronanu mezi sebou propleteny, což zajišťuje netypické reologické vlastnosti. Při vyšší koncentraci mají roztoky extrémně vysokou viskozitu závislou na smykové rychlosti. Roztok o koncentraci 1 % je jako želé, ale pokud na něj působí tlak, pohybuje se snadno. Takové látky jsou označovány jako pseudo-plastické materiály a mohou být aplikovány pomocí injekční jehly. Roztoky hyaluronanu jsou tedy ideálními lubrikanty a bylo dokázáno, že snižují srůstání tkání po operacích dutiny břišní i ortopedických zákrocích [4].

### 2.1.3 Polymerní struktura

Syntázy hyaluronanu syntetizují velké, lineární polymery s opakující se disacharidovou strukturou pomocí střídavého připojování kyseliny glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu na rostoucí řetězec. K tomu jsou využívány jako substráty aktivované nukleotidové cukry (UDP-kyselina glukuronová a UDP-N-acetylglucosamin). Počet opakujících se disacharidových jednotek u dokončené molekuly hyaluronanu může být 10000 a více a molekulová hmotnost se tak pohybuje okolo 4000000 Da. Molekulová hmotnost každého disacharidu se pohybuje okolo 400 Da a jejich délka je asi 1 nm. Molekula s 10000 jednotek by pak měřila přibližně 10  $\mu\text{m}$  a její velikost by byla stejná jako velikost průměrného lidského erytrocytu [1], [4].

#### 2.1.4 Výskyt

Hyaluronan se přirozeně vyskytuje ve všech živých organismech, především v extracelulární matrix, ale byla prokázána i intracelulární přítomnost. Hojně se vyskytuje v lidském těle a zastává mnoho funkcí.

U člověka má největší množství hyaluronanu lidský plod. Po narození a s přibývajícím věkem tuto látku z těla postupně ztrácíme. Změnu můžeme pozorovat ve formě stárnutí kůže a tvorbě vrásek, či bolesti kloubů [5].

#### 2.1.5 Výroba

Tento glykosaminoglykan byl tradičně získáván z živočišných tkání, jako jsou kohoutí hřebínky, synoviální tekutina, chrupavky, oční sklivec a pupeční šňůra. Komerčně se HyA vyrábí extrakcí z kohoutích hřebínků nebo fermentací. HyA vyrobené oběma cestami jsou chemicky identické. Ale shromažďování hřebínků, extrakce a purifikace byly časově náročné a pracné a výroba kyseliny tedy velmi nákladná. Kromě toho, v živočišných tkáních se HyA vyskytuje v komplexu s proteoglykany a často dochází k jejímu znečištění degradujícími enzymy. Takže izolace vysoce čisté HyA o vysoké molekulové hmotnosti je obtížná. Navíc živočišné materiály pro biomedicínské aplikace podléhají čím dál přísnějším kontrolám.

V průmyslové výrobě se tedy přechází k získávání HyA pomocí mikroorganismů. Především pomocí bakterií, které mohou obsahovat stejný typ hyaluronanu, jaký se vyskytuje u savců. Jedná se především o mikroorganismy kmene streptokoků jako je např. *Streptococcus equistimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* a *Pasteurella multocida*. Proces fermentace má nižší výrobní náklady, je bez sezonních vlivů a jednotlivé šarže jsou bez větších změn než při živočišné výrobě [6].

#### 2.1.6 Biologické funkce

Hlavní biologickou funkcí hyaluronanu je udržování správných viskoelastických vlastností tekutin pojivových tkání, jako je synoviální tekutina v kloubech a oční sklivec, dále tkáňová hydratace, transport vody, mitosa a migrace buněk, vývoj tumoru a metastáz. V organismu váže vodu a promazává pohyblivé části těla, jako jsou klouby a svaly. Ve velkém zastoupení se hyaluronan nachází v očním sklivci, v lidské kůži, v kloubní chrupavce, ženských pohlavních buňkách a dalších částech těla, kde zajišťuje hydrataci, výplň a izolaci, lubrikaci či ochranu jako selektivní bariéra.

Díky jeho konzistenci může být použit v kosmetických přípravcích. Především v produktech pro péči o pleť jako je hydratační krém, neboť je jednou z nejvíce hydrofilních látek v přírodě [5].

### 2.2 Asociativní (micelární) koloidy

Jako asociativní koloidy jsou označovány nízkomolekulární látky, které za nízkých koncentrací poskytují pravé roztoky. Po překročení určité koncentrace se molekuly začnou shlukovat a vytváří koloidní částice neboli micely. Asociativní koloidy jsou také často známy pod pojmy povrchově aktivní látky (PAL), či tenzidy.

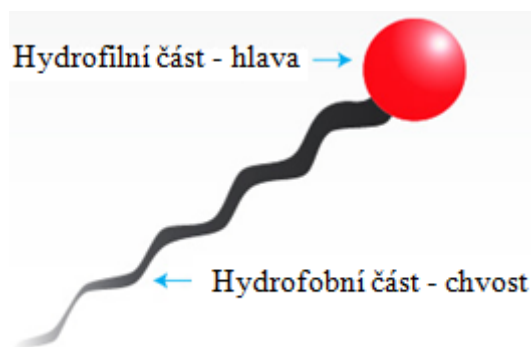
Tyto systémy bývají často řazeny mezi lyofilní soustavy, neboť jsou rozpustné v disperzním prostředí a nepotřebují umělou stabilizaci. Fyzikální vlastnosti jsou dány okamžitými stavovými veličinami (teplota, tlak, koncentrace) a micelární koloidy jsou tedy reverzibilní systémy [9].

Díky svým schopnostem jako je smáčení, emulgace, pění a čištění mají tenzidy široké využití v praxi. Setkáváme se s nimi v kosmetice, čistících, pracích a mycích prostředcích. Důležitou roli mohou hrát i v medicíně jako nosiče léčiv [7].

### 2.2.1 Molekulární struktura micelárních koloidů

Schopnost vytvářet micely má jen zvláštní skupina molekul. Jedná se o povrchově aktivní látky, které mají amfifilní neboli amfipatický charakter. Jejich molekula obsahuje skupiny, které zaručují rozpustnost, díky vysoké afinitě k rozpouštědлу, a současně je druhá část molekuly sama o sobě v daném prostředí nerozpustná. Molekula se tedy skládá z části lyofilní, která se v daném prostředí rozpustí, a části lyofobní, která je v témže prostředí nerozpustná a je příčinou asociace a vzniku micel.

Pokud se jedná o povrchově aktivní látky rozpustné ve vodném prostředí, je molekula složena z hydrofilní polární skupiny (hlava), která zajistí rozpustnost, a silně hydrofobní nepolární částí (ocas), která je nejčastěji tvořena jedním nebo dvěma nasycenými uhlovodíkovými řetězci, či heterocyklickým nebo aromatickým kruhem. Aby molekula dosáhla vlastností povrchově aktivních látek a mohlo dojít k asociaci za vzniku koloidní disperze, musí být uhlovodíkový řetězec dostatečně dlouhý. Minimální počet pro vznik micely je osm atomů uhlíků, s délkou řetězce však zároveň klesá rozpustnost micel ve vodě [9].



Obr. 2: Molekula povrchově aktivní látky [10]

### 2.2.2 Povaha tenzidů

Tenzidy mají díky amfifilní struktuře značně charakteristické vlastnosti závislé především na jejich koncentraci. Ve zředěných roztocích se jednotlivé molekuly shromažďují na mezifázovém rozhraní. Hnací silou je snaha, co nejvíce omezit kontakt mezi povahově rozdílnými molekulami. V systému voda/vzduch je hydrofobní část molekuly vytlačována směrem ven, hydrofilní naopak zůstává v roztoku. Tím je sníženo povrchové napětí rozpouštědla, a proto jsou tyto látky označovány jako povrchově aktivní látky. Obdobné chování tenzidů zaznamenáme i u dvou navzájem nemísitelných roztoků. Se zvyšující se koncentrací dochází k postupnému nasycení mezifázového povrchu molekulami tenzidů. V určitém bodě dojde k přesycení povrchu, molekuly začnou agregovat a vznikají micely [12].

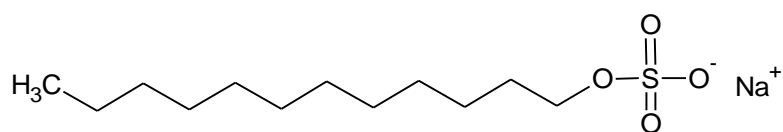
Zvláštní skupinou tenzidů jsou gemini-tenzidy, což jsou dimery tenzidu, kdy dvě amfifilní molekuly spojuje tzv. raménko (spacer). Řetězec raménka může být jak hydrofilní, tak

hydrofobní povahy, ohebný nebo stabilní, a váže oba diméry přímo v místě hydrofilní části, případně v její blízkosti [13].

Koloidní povrchově aktivní látky jsou podle schopnosti disociovat ve vodném prostředí rozdělovány na iontové a neiontové. Iontové jsou nositelé náboje a jsou členěny na anionaktivní, kationaktivní, a amfoterní [12].

### 2.2.2.1 Aniontové PAL

Aniontové tenzidy jsou největší skupinou tenzidů, tvoří více jak 50 % světové produkce a při disociaci ve vodě tvoří anionty. Funkčními skupinami jsou  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ , jako nejčastější protiionty jsou uváděny sodík, draslík, vápník, amoniový ion či různě protonované alkylové aminy. Mezi anioaktivní tenzidy se řadí např. stearan sodný, dodecylsulfát sodný (SDS). Sloučeniny jsou citlivé na tvrdou vodu, nejcitlivější jsou karboxyláty a nejméně citlivé sulfáty a sulfonáty [14].



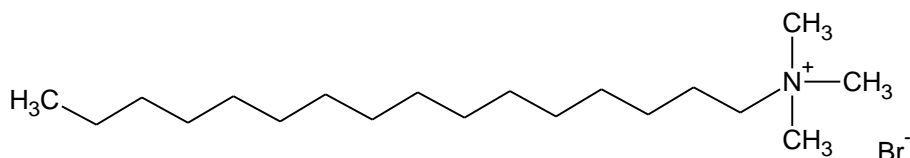
Obr. 3: Dodecylsulfát sodný (SDS)

Nejdůležitějšími zástupci v praxi jsou mýdla, která jsou snadno biologicky rozložitelná a tím vodohospodářsky málo závadná. Při pH 8 – 10 mají sodné soli alkyl sulfátů nejlepší prací účinnost, v neutrálním prostředí slouží jako změkčovače [12].

Aniontové surfaktanty nejsou ve většině případů kompatibilní s kationtovými. V roztoku, kde se objeví oba typy tenzidů, se z velkého kationtu a velkého aniontu začne tvořit slabě disociující sůl o velké molární hmotnosti, která je ve vodném roztoku prakticky nerozpustná.

### 2.2.2.2 Kationtové PAL

Kationtové tenzidy se řadí do třetí největší třídy tenzidů. Ve vodném prostředí disociují na kationty a většina těchto tenzidů je založena na dusíku, který nese kladný náboj. Nejběžněji se setkáváme s aminovou formou nebo kvarterními amoniovými solemi. Aminy nemohou být použity v prostředí s vysokým pH. Kvarterní soli se dobře rozpouštějí ve vodě a v alkoholech a se zvyšující se teplotou jejich rozpustnost roste. Nosičem náboje ale mohou být i sulfonové a sulfoxidové skupiny. Zástupcem je cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), oktaedecyltrimethylamoniumchlorid a další [13].



Obr. 4: Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB)

Cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) je často používán jako povrchově aktivní látka vhodná pro izolaci DNA rostlin a jiných organismů s vysokou molekulovou hmotností a zároveň k množení (amplifikaci) specifických úseků DNA rostlin. CTAB našlo uplatnění při stanovení molekulových hmotností proteinů v elektroforetických systémech a výjimkou není

Cena kationtových PAL je obvykle vyšší než aniontových surfaktantů, neboť jejich syntéza vyžaduje složitější podmínky. V praxi mají tyto tenzidy antibakteriální účinek, proto se využívají jako antiseptika, desinfekční činidla, bakteriocidy, fungicidy a deodoranty [16] [17].

Nejmenší třídou tenzidů jsou amfoterní povrchově aktivní látky, které jsou také nazývány zwitteriontové. V jedné molekule jsou přítomny dvě hydrofilní skupiny, proto mohou mít tyto surfaktanty v závislosti na pH kladný nebo záporný náboj. Najdou se ale i látky, které na pH citlivé nejsou.

CCCCCCCCCCCC[N+](C)(C)CC(=O)[O-]

Neiontové tenzidy nejsou schopny elektrolyticky disociovat. Obvykle jsou složeny z dlouhého uhlovodíkového řetězce s několika polárními, neiontovými skupinami na konci. Počet těchto skupin se pohybuje v rozmezí od 3 do 30. Obvykle se jedná o polyetherové nebo hydroxylové skupiny, které v závislosti na počtu zajistí různou rozpustnost sloučenin. Dají se vytvořit látky slabě až silně hydrofilní, s čímž se mění i vlastnosti jako je smáčivost, pěnovitost a další. Fyzikálně-chemické vlastnosti jsou závislé na teplotě, a proto se tyto sloučeniny stávají při vyšších teplotách více hydrofobními.

$$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\left[\text{CH}_2-\text{O}\right]_m-\text{OH}$$

Roztoky s velmi nízkou koncentrací tenzidu se chovají jako pravé roztoky. Molekuly PAL se snaží dosáhnout stavu s minimální energií. Pokles celkové volné energie systému je zajištěn

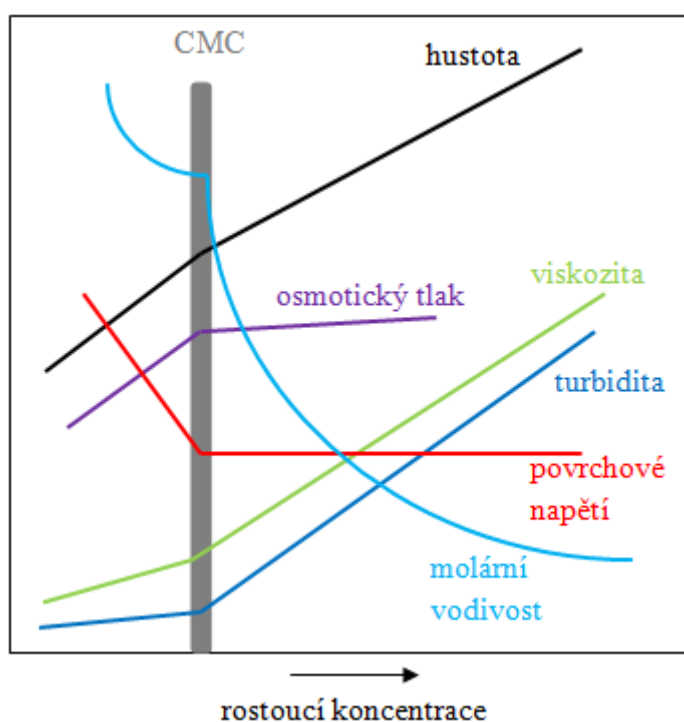
výskytem molekul tenzidu na povrchu nebo mezifázovém rozhraní. Se zvyšující se koncentrací a narůstajícím nasycením mezifázového rozhraní se toto rozložení stává nemožným. Změna volné systémové energie je závislá na změnách entropie a entalpie a to podle vzorce:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Při výpočtu volné energie micelárního systému při pokojové teplotě je nejdůležitějším členem této rovnice změna entropie. Tvoří přibližně 90–95 % hodnoty  $\Delta G$  [13].

Při překročení určité koncentrace dochází k agregaci monomeru a ke vzniku koloidních útvarů (micel). Tato koncentrace je označována jako kritická micelární koncentrace (CMC) a je nejvyšší možnou koncentrací, při které jsou látky ještě ve formě monomerních jednotek. Nad touto koncentrací jsou v systému přítomny micely. Kritická micelární koncentrace nenabývá vysokých hodnot, pro různé tenzidy se nachází v rozmezí  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> [9].

Díky vzniku micel dochází ke změnám fyzikálně-chemických vlastností roztoků povrchově aktivních látek. Systém složený z volných monomerních jednotek vykazuje odlišné chování než systém obsahující micely. Proto je možné kritickou micelární koncentraci stanovit hned několika metodami jako je měření povrchového napětí, molární vodivosti, viskozity a další (obr. 7). V ideálním případě dostaneme z měření dvě protínající se přímky, jejichž průsečíkem je hodnota CMC. Tato hodnota ale nemusí být pro všechny typy veličin úplně shodná, protože vlastnosti systému jsou tvorbou micel měněny různým způsobem.



Obr. 7: Změna vybraných fyzikálních vlastností PAL při překročení CMC [9]

Při měření povrchového napětí dostaneme ve zředěných roztocích prudký pokles hodnot  $\gamma$ . Po překročení hodnoty CMC už je průběh konstantní, neboť přidavek monomeru způsobí jen další tvorbu povrchově neaktivních micel. U molární vodivosti je zaznamenán nejprve mírný a po překročení CMC prudký pokles, ačkoli je iontová vodivost micel větší než vodivost volných iontů. S vyšší koncentrací na micely ulpívá část elektrické dvojvrstvy, která u micely způsobí menší pohyblivost a celkovou nižší molární vodivost. Osmotický tlak se vzrůstající

koncentrací nejprve prudce roste, nad kritickou molární koncentrací je růst značně pomalejší. Přídavek tenzidu způsobí jen další tvorbu micel. Průběh závislosti vlastností systému na koncentraci je pro hustotu a viskozitu značně podobný. Se zvyšující se koncentrací naměřené hodnoty rostou, po překročení CMC nastane jen malá změna. Na křivce je nepříliš výrazný zlom [11].

Důležité jsou i optické vlastnosti systému. K charakterizaci vlastností roztoků povrchově aktivních látek se především využívá měření rozptylu světla a indexu lomu. Turbidita systému je závislá na molární hmotnosti. Proto pro hodnoty turbidity systému pod kritickou micelární koncentrací je směrnice křivky velmi malá. Zdrojem rozptylu světla jsou jednotlivé molekuly rozpuštěného tenzidu. Po překročení CMC, v přítomnosti micel, dochází ke značnému rozptylu světla a intenzita rozptylu rychle vzroste. Touto metodou je možné určit i agregační číslo a hodnotu náboje micel. Další možností jak stanovit hodnotu CMC je fluorescenční a infračervená spektroskopie a potenciometrie [9] [13].

Při vysokých koncentracích je na křivkách koncentračních závislostí vlastností roztoků PAL pozorován další zlom. Jedná se o druhou kritickou micelární koncentraci a vysvětlením tohoto jevu jsou změny v interakcích mezi micelami a monomery a změny typu agregace.

Na křivce koncentrační závislosti se objevuje zlom i před stanovenou hodnotou CMC. V roztoku PAL, za přítomnosti polymeru, dochází po překročení určité koncentrace tenzidu k agregacím mezi přítomnými látkami, nevznikají však micely. Tato koncentrace je označována jako kritická agregační koncentrace (CAC) a její hodnota je o mnoho nižší než hodnota CMC v roztoku samotného tenzidu [18].

### **2.2.3.1 Faktory ovlivňující vznik micel**

Na hodnotu kritické micelární koncentrace má vliv více faktorů. Hlavní význam má chemická struktura, tlak, dále přítomnost příměsí a nemalý podíl tvoří teplota [8].

Chemická struktura povrchově aktivní látky je základním faktorem ovlivňujícím tvorbu micel. Kritická micelární koncentrace závisí na délce a struktuře uhlovodíkového řetězce, na vlastnostech hydrofilní skupiny a u iontových molekul dokonce na vlastnostech disociovaných protiiontů. U iontových tenzidů hodnota CMC klesá s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce. U látek s rozvětveným řetězcem, stejně tak u uhlovodíkového řetězce s dvojnými vazbami zaznamenáme vyšší hodnoty CMC. Značný vliv na CMC má i charakter hydrofilní skupiny. Hodnota kritické micelární koncentrace aniontových tenzidů bude při stejné délce uhlovodíkového řetězce nižší než u kationtových. U molekul se stejnou délkou uhlovodíkového řetězce bude CMC iontových PAL až o dva koncentrační řády vyšší než u neiontových, kde navíc záleží na rozměrech a povaze hydrofilní skupiny.

Zásadní vliv má teplota, která může hodnotu CMC snižovat i zvyšovat. U iontových PAL většinou dojde s rostoucí teplotou ke zvýšení CMC, u neiontových ke snížení. Mnoho látek v nasyceném stavu za nízké teploty micely netvoří. Až při zvyšování a překročení určité teploty vzniknou v systému micely. Tento teplotní bod je označován jako Krafftova teplota. Její hodnota silně závisí na délce hydrofobního řetězce a na typu protiiontu.

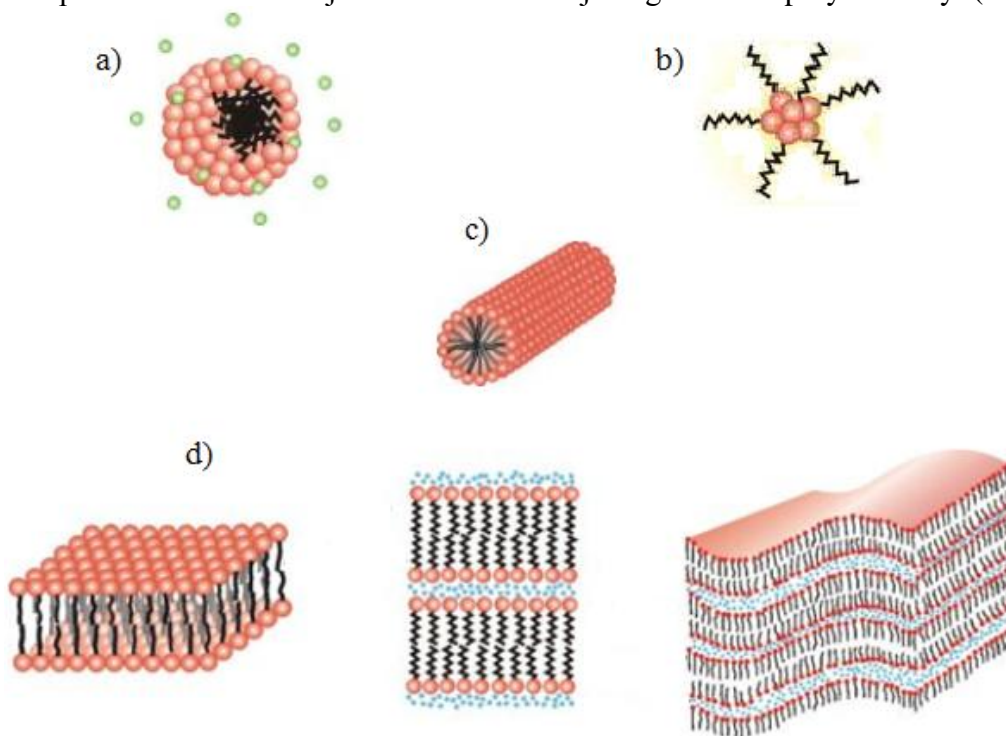
Hodnoty CMC dále ovlivňuje přítomnost cizích látek. Nejvíce sníží hodnotu CMC jednoduché anorganické elektrolyty v závislosti na jejich koncentraci. Se zvyšující se koncentrací elektrolytu klesá hodnota CMC. Přídavek elektrolytu má za následek i změnu agregačního čísla k vyšším hodnotám.

Tlak nemá na hodnoty CMC velký vliv ani v oblasti velmi vysokých tlaků.

### 2.2.3.2 Velikost a tvar micel

Existuje mnoho různých druhů micel. Na velikost a tvar micel má vliv koncentrace tenzidu, teplota systému, struktura látek, mezimolekulární síly a další. Podle charakteru prostředí se micely dělí na základní dvě skupiny: klasické a obrácené (inverzní).

Ve vodném (polárním) prostředí se micela uzavírá tak, že na povrchu zůstávají hydrofilní části, a jádro je tvořeno hydrofobními řetězci, aby jejich styk s vodou byl co nejmenší. Vznikají tak micely s hydrofobní dutinou. Pokud se jedná o agregaci iontových tenzidů, je micela obklopena elektrickou dvojrůstvou a chová se jako globulární polyelektrolyt (obr. 8).



Obr. 8: a) Hartleyova (kulovitá) micela, b) inverzní micela, c) válcovitá micela, d) laminární (McBainovy) micely [9]

Nejjednodušším typem micel jsou malé, sférické (Hartleyovy) micely, které se vytváří v málo koncentrovaných vodných roztocích. Uhlovodíkové řetězce jednotlivých molekul jsou propleteny ve středu jádra, polární skupiny směřují na povrch. Poloměr micely je přibližně roven délce molekuly tenzidu tvořícího agregát. Charakteristickým znakem velikosti a tvaru micel je agregační číslo. Udává, kolik molekul tenzidu tvoří strukturu micely. Obecně roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s rostoucím rozměrem polární skupiny. Agregační číslo sférických micel je nízké a pohybuje se v rozmezí počtu molekul tenzidů 50-150.

Při zvyšování koncentrace roztoku jsou přítomny nejenom kulovité micely, ale i agregáty jiných tvarů. Dochází k rovnoběžné orientaci uhlovodíkových řetězců, k prodloužení jádra, zvětšuje se rozměr a ze sférických se stávají válcové micely. Délka těchto micel je náhodná, proto je zaznamenána vysoká polydisperzita.

Při nejvyšších možných koncentracích vznikají laminární (McBainovy) micely. Ty jsou složeny ze dvou vrstev tenzidů, kde pořád zůstává zachována stejná struktura (hydrofobní řetězce propleteny do sebe, hydrofilní skupiny směřují ven). Díky charakteristickému uspořádání molekul přechází dostatečně koncentrované roztoky tenzidů často v gel.

V nepolárním prostředí vznikají obrácené (inverzní) micely. Jádro takových micel tvoří hydrofilní skupiny a uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí. Jedná se o



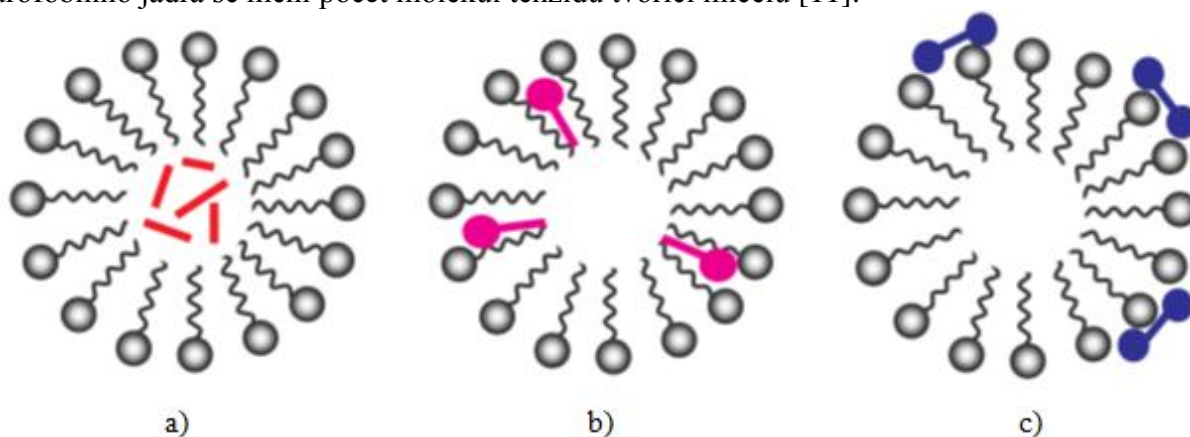
micely s hydrofilní dutinou, které jsou o mnoho menší než sférické micely. Agregační číslo běžně nepřekročí hodnotu 10 monomerů na jednu micelu. Stejně jako u micel v polárním prostředí dochází se zvyšující se koncentrací ke změnám tvarů a formují se např. válcové micely (obr. 8) [8], [9], [11].

#### 2.2.4 Solubilizace

Některé látky hydrofobní či amfifilní povahy jsou v čistém vodném prostředí zcela nerozpustné nebo jen částečně rozpustné. K jejich lepšímu rozpuštění často dochází v micelárním roztoku. Tento jev, kdy jsou v micelách tenzidů rozpuštěny i další látky, je nazýván solubilizace. Většinou nastává v případech kdy je koncentrace tenzidu vyšší než CMC a schopnost solubilizovat roste s rostoucí koncentrací tenzidu.

Solubilizovaná látka je zahrnuta v micelle a není přítomna v disperzním prostředí koloidního roztoku. Umístění v micelle závisí na její molekulární struktuře. Nepochopitelně jsou solubilizovány v jádru micely. Látky polární jsou zachyceny na povrchu micely nebo v jeho těsné blízkosti. U amfifilních molekul směřuje uhlovodíkový řetězec dovnitř micely a polární skupina do vodné fáze (obr. 9).

Při solubilizaci dochází ke zvyšování hmotnosti micel. To je dáno především zabudováním nových látek do micel, ale také nárůstem agregačního čísla. Díky zvětšování objemu hydrofobního jádra se mění počet molekul tenzidu tvořící micelu [11].



Obr. 9: Mechanismus solubilizace. Schéma rozpouštění a) nepolární, b) amfifilní a c) polární látky v micelárním systému

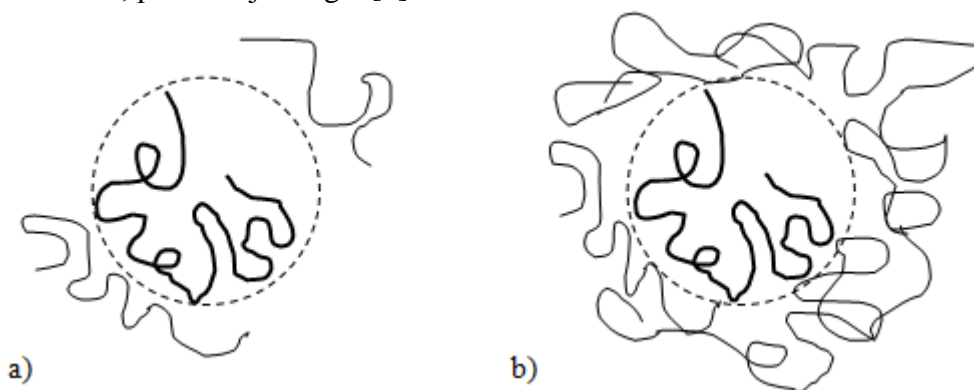
#### 2.2.5 Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek

Vysokomolekulární látky tvoří ve vodě nebo organickém rozpouštědle pravé roztoky. Disperzní částice nejsou složeny jako micely ze shluku malých molekul, ale jedná se o jednotlivé molekuly koloidních rozměrů, tedy soustavy vázané chemickými valenčními silami. Velikost molekul se pohybuje okolo 10 až 15 kg·mol<sup>-1</sup> a jejich vlastnosti jsou závislé nejen na rozměru, ale i tvaru a struktuře. Podle tvaru molekul jsou tyto látky rozdělovány na lineární polymery, větvené polymery, nekonečné síťovité struktury a globulární makromolekuly. Podle chemické povahy se molekuly řadí do anorganických nebo organických vysokomolekulárních látek. Koloidní roztoky tvoří pouze lineární a některé globulární polymery.

Ve zředěném roztoku vysokomolekulárních látek jsou jednotlivé makromolekuly obklopeny pouze spojitou fází rozpouštědla. Klubka jsou v roztoku rozmístěna nahodile,

existují i oblasti s nulovou koncentrací polymeru. Zředěný roztok je tedy koncentračně nestejnorodý (obr. 10a).

Při zvyšování koncentrace roztoku polymeru přestává platit definice pro zředěný roztok, neboť celý prostor roztoku je vyplněn polymerem a jednotlivé řetězce se začínou překrývat a proplétat (obr. 10b). V málo koncentrovaných roztocích jsou tyto asociace jen dočasné, k rozrušení dochází tepelným pohybem, v koncentrovanějších roztocích se tvoří velmi řídká, ale spojitá struktura, přecházející v gel [8].



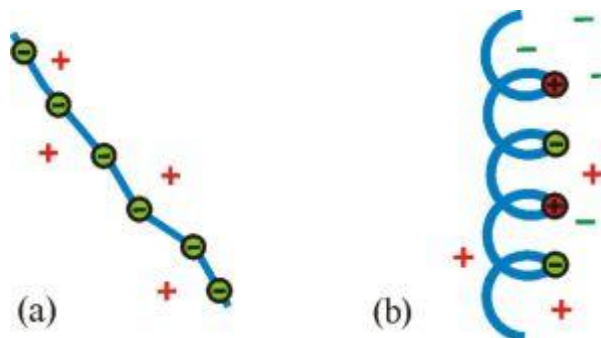
Obr. 10: Struktura roztoku polymeru a) zředěný roztok, b) koncentrovaný roztok [8]

### 2.2.6 Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů

Molekuly řady vysokomolekulárních látek, které obsahují iontové skupiny a v roztoku vytváří ionty, tedy disociují, jsou nazývány polyelektrolyty. Podle povahy skupin se dělí na kyselé, bazické a amfoterní. Příkladem polyelektrolytu s kyselými skupinami je kyselina hyaluronová, která ve své molekule obsahuje karboxylové skupiny

Chování makromolekul elektrolyticky disociujících v roztoku je ovlivněno kromě mezimolekulárních disperzních sil i silami elektrostatickými. V případě, že roztok neobsahuje žádný jiný elektrolyt než jen vysokomolekulární, je vliv elektrostatických sil velký. Při přidávku malého množství nízkomolekulárního elektrolytu dojde k zeslabení tohoto vlivu.

Lineární molekula obsahující pouze náboje stejného znaménka se jen málo svinuje do klubka a ve zředěných roztocích ji spíše nalezneme ve formě nataženého řetězce (obr. 11a). Tento jev způsobují velké odpudivé síly mezi souhlasně nabitými skupinami. Tvar makromolekuly však ovlivňují i malé opačně nabitě ionty přítomné v roztoku, které vytvářejí kolem makromolekuly iontovou atmosféru opačného náboje. Tato vrstva zeslabuje odpudivé účinky elektrostatických sil. Aby šlo o iontovou atmosféru, musí v blízkém okolí centrálního iontu převládat četnost iontů s opačným znaménkem (protiiontů) nad četností iontů souhlasně nabitých (koiontů). Pokud je do roztoku vložen nízkomolekulární elektrolyt, stoupá iontová síla roztoku, zároveň dochází ke stlačení iontové atmosféry kolem nabitých skupin a makromolekula se svine do klubka. Původně natažený řetězec se svine již po přidávku malého množství elektrolytu. Podobný vliv jako malý přírůstek nízkomolekulárního elektrolytu má i zvýšení koncentrace polyelektrolytu. U amfoterních makromolekul, kde se pravidelně střídají kladné a záporné náboje, které na sebe působí přitažlivými silami, se řetězce svinují do spirálovitého nebo cívkovitého tvaru (obr. 11b) [9].



Obr. 11: Tvar vysokomolekulárních polyelektrolytů a) makromolekula se souhlasnými náboji ve zředěném roztoku bez nízkomolekulárního elektrolytu, b) amfoterní makromolekula s pravidelně se střídajícími kladnými a zápornými náboji [9]

## 2.3 UV-VIS spektroskopie

UV-VIS spektroskopie je jednou z nejstarších analytických metod, které se i dnes často uplatňují. Vyniká svojí experimentální nenáročností a rychlostí, ale zároveň přesností a citlivostí. Jedná se o optickou metodu, kde principem je studium vlastností elektromagnetického záření interagujícího s hmotou či hmotou vysílaného. Díky tomu, že dochází k výměně energie mezi zářením a hmotou, jde o metodu spektrální. Energie je absorbována vazebnými i nevazebnými elektrony molekulárních orbitalů látek a tím tato spektroskopie spadá do molekulové absorpční spektrometrie [19].

K absorpci elektromagnetického záření dochází v oblasti ultrafialového a viditelného světla (interval 200–800 nm) a při absorpci je vyvolána změna energetického stavu molekul. Nejčastěji dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Tato změna může mít energii  $\Delta E_e$  150–600 kJ·mol<sup>-1</sup>. U molekul nesmí být ale opomenuty ani energetické změny vibračního stavu  $\Delta E_v$  (2–60 kJ·mol<sup>-1</sup>) a stavu rotačního  $\Delta E_r$  (3 kJ·mol<sup>-1</sup>). Celková energie molekuly ve vztahu k vlnové délce absorbovaného záření je ve formě:

$$\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (2)$$

kde  $h$  je Planckova konstanta ( $h=6,626 \cdot 10^{-34}$  J·s),  $c$  rychlost světla a  $\lambda$  vlnová délka [20], [21].

Za běžných podmínek jsou molekuly v základní elektronové i vibrační hladině. Aby mohlo dojít k absorpci energie látkou, musí být v látce minimálně dvě hladiny, a to hladina základní a excitovaná. Po absorpci fotonu dochází k excitaci molekuly a valenční a nevazebné elektrony přechází do vyšších energetických hladin. V tomto excitovaném stavu přetrvává molekula pouze 10<sup>-9</sup> s. Poté následuje zářivý či nezářivý přechod elektronů na základní nebo nižší energetickou hladinu orbitalu. Výsledná spektra se zdají být spojitá, tedy pásová, neboť se na jejich podobě podílí nejen elektronové hladiny, ale i vibrační a rotační podhladiny [19].

### 2.3.1 Spektrální oblasti

UV-VIS spektroskopie pracuje nejčastěji v rozmezí vlnových délek 200–800 nm, což tvoří jen velmi malou část celkového spektra záření. Ve vzdálené UV oblasti (vakuové) s vlnovými délkami menšími než 190 nm absorbují pouze látky nasycené. V blízké UV oblasti (190–380 nm) absorbují sloučeniny polynenasycené a aromatické [21].

Při měření absorbance je ze vstupujícího monochromatického toku záření  $I_0$  část absorbována, rozptýlena a odražena. Zbylá část záření, která projde roztokem vzorku, je zaznamenána jako vystupující zářivý tok  $I$ . Podíl zářivých toků vyjadřuje propustnost (transmittance):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

Transmittance se vždy nachází v intervalu  $<0;1>$  a často se uvádí v procentech.

Transmittance je obvykle velmi malá, proto se na většině spektrofotometrů odečítá hodnota absorbance  $A$  vyjadřující záporně vzatý logaritmus transmittance:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

Pokud je absorpce záření jednotková (100%), transmittance je nulová [25], [26].

### 2.3.2 Přechody dle kvantové chemie

Absorpční pásy komplexů v UV-VIS oblasti spektra můžeme rozdělit dle intenzit pásů. Intenzitu pásu vyjadřuje hodnota molárního absorpčního koeficientu  $\epsilon_{\max}$ . Hodnota  $\epsilon_{\max}$  je míra pravděpodobnosti přechodu elektronu do vyšší energetické hladiny. Čím je daný přechod pravděpodobnější, tím více se absorbuje záření odpovídající energie. Rozlišují se tři typy přechodů: přechody dovolené, symetricky zakázané a spinově zakázané.

Přechody dovolené zahrnují přechody ze základní singletové do excitované singletové hladiny. Patří sem přechod  $\pi \rightarrow \pi^*$  a přechod přenosu náboje. Pásy jsou velmi intenzivní, jejich hodnoty jsou v rozmezí  $10^4$ - $10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Přechody symetricky zakázané jsou přechody, kdy dojde ke změně dipólového momentu díky rozdělení elektronů po vibraci jader. Symetricky zakázaný je přechod  $n \rightarrow \pi^*$  a jeho intenzita dosahuje nízkých hodnot ( $10^2 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Přechody spinově zakázané jsou málo pravděpodobné. Jedná se o přechody ze základní singletové hladiny do excitované tripletové hladiny. Jejich intenzita absorpčního pásu je velmi malá ( $10^0 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [19], [20].

### 2.3.3 Typy elektronových přechodů

Absorpci UV-VIS záření odpovídá excitace vnějších elektronů. Existují tři typy elektronových přechodů. Jedná se o přechody intramolekulové, přechody přenosu náboje (charge-transfer, CT) a přechody d-d.

#### 2.3.3.1 Intramolekulové přechody

Intramolekulové přechody nastávají mezi vazebnými a antivazebnými orbitaly ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$  a  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) a mezi nevazebnými a antivazebnými orbitaly ( $n \rightarrow \sigma^*$  a  $n \rightarrow \pi^*$ ) (obr. 12).

Přechod  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  nastává u sloučenin bez chromoforů, které obsahují jen jednoduché vazby. Elektron ve vazebném  $\sigma$  orbitalu je excitován do antivazebného  $\sigma^*$  orbitalu. Energie přechodu je obrovská, přechod do antivazebného molekulového orbitalu je náročný. Absorpční maximum se neobjevuje v rozmezí typickém pro UV-VIS spektra (200–700 nm) a při běžných měřeních se toto maximum nesleduje. Příkladem jsou molekuly methanu, kde jsou pouze CH vazby, a absorpční maximum je při 125 nm. Látky jako jsou uhlovodíky a voda jsou proto vhodnými rozpouštědly vzorků pro měření spekter.

Přechod  $n \rightarrow \sigma^*$  umožňují nasycené sloučeniny obsahující atomy s volným elektronovým párem. Tyto přechody potřebují obecně méně energie než přechody  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  a jsou iniciovány

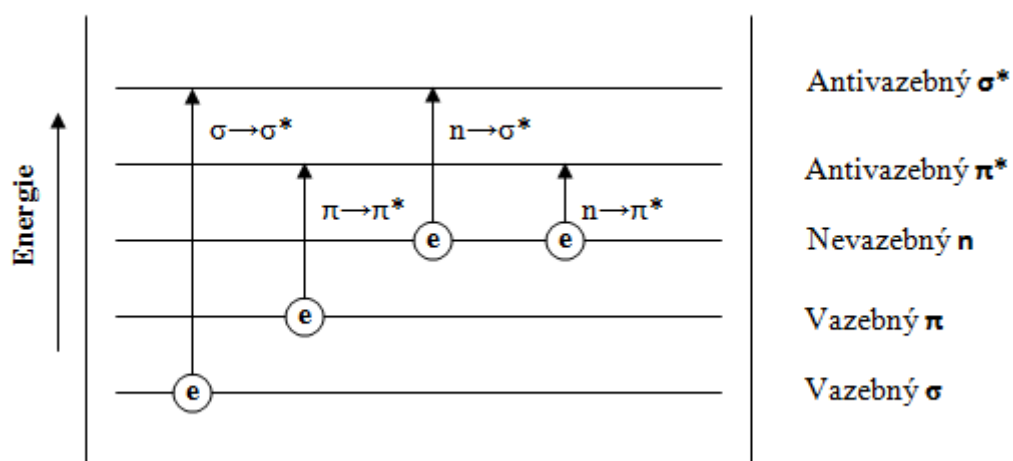
zářením o vlnových délkách 150–250 nm. Množství organických funkčních skupin s  $n \rightarrow \sigma^*$  přechodem a maximem píku v UV oblasti je malý. Příkladem jsou nasycené sloučeniny s heteroatomy S, N, Br a I, které absorbují do 200 nm, a O a Cl, které absorbují nad 200 nm.

Přechod  $\pi \rightarrow \pi^*$  je charakteristický pro sloučeniny s násobnými vazbami obsahujícími  $\pi$ -elektrony. Jedná se především o alkeny, alkyny, areny, aldehydy a ketony a mnoho dalších. Přechody  $\pi \rightarrow \pi^*$  jsou dovolené a intenzivní.

Přechod  $n \rightarrow \pi^*$  patří mezi symetricky zakázané přechody. Intenzita není příliš vysoká a absorpční maximum je závislé na druhu atomu. Do antivazebného orbitalu  $\pi^*$  přechází při absorpci záření elektrony volných elektronových párů. Energetický rozdíl pro přechod  $n \rightarrow \pi^*$  je menší než při přechodu  $\pi \rightarrow \pi^*$ , proto jsou absorpční pásy přechodu  $n \rightarrow \pi^*$  ve vyšších vlnových délkách než pásy přechodu  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Absorpční spektroskopie organických sloučenin je většinou založena na přechodu  $n$  nebo  $\pi$  elektronů do antivazebného orbitalu  $\pi^*$ . To je dáno tím, že absorpční pásy těchto přechodů spadají do experimentálně výhodné oblasti elektromagnetického spektra. Skupina atomů v molekule, která způsobuje absorpci v UV-VIS oblasti se nazývá chromofor.

V látkách s konjugovanými dvojnými vazbami se s rostoucím počtem těchto vazeb posouvá absorpční pás přechodu  $\pi \rightarrow \pi^*$  k vyšším vlnovým délkám. Energie nejvýše obsazeného orbitalu se zvýší, zatímco energie nejnižšího neobsazeného antivazebného orbitalu se sníží a celková energie přechodu je menší. Maximum absorpce se posouvá k vyšším vlnovým délkám, čím je konjugovaný systém delší. Substituent nebo skupina atomů s volným elektronovým párem (např.  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ), který v konjugaci s  $\pi$ -elektronovým chromoforem vyvolává obvykle posun absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám je nazýván auxochrom. Posun k vyšším vlnovým délkám je označován jako bathochromní (červený) posun. Pokud roste polarita substituentů vázaných na chromofory a zároveň roste polarita rozpouštědla, posune se absorpční pás k nižším vlnovým délkám. Ten je označován jako hypsochromní (modrý) posun a jeho příčinou je vyšší solvatace volného elektronového páru, která sníží energii  $n$  orbitalu [19], [22], [23].



Obr. 12: Elektronové přechody v molekule

Hodnota molárního absorpčního koeficientu  $\epsilon_{\text{max}}$  přechodu  $n \rightarrow \pi^*$  je relativně nízká, dosahuje hodnot 10–100  $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Přechody  $\pi \rightarrow \pi^*$  mají rozmezí hodnot 1000–10000  $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.3.2 *Přechod přenosu náboje*

Mnoho anorganických látek absorbuje záření za přenosu náboje a jsou označovány jako tzv. komplexy přenosu náboje. Jedna ze složek komplexu musí být elektrondonorní a druhá musí mít elektronakceptorní vlastnosti. Absorpce záření pak způsobí přenos elektronu z orbitalu donoru na orbital akceptoru. Maximum pásu komplexu může být v jiné vlnové délce, než jsou maxima absorpcí jednotlivých složek. Může tedy dojít k zabarvení, původně nezabarvených složek. Výsledné absorpční pásy jsou velmi intenzivní, molární absorpční koeficient je vyšší než  $10000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [22].

### 2.3.3.3 *Přechody d-d*

Přechod d-d odpovídá přechodu elektronu z d orbitalu jednoho kovu na d orbital jiného kovu. Problémem je, že d orbitály mají g symetrii a přechod d-d je symetricky zakázán. Molární absorpční koeficient je menší než  $100 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , intenzita tohoto přechodu je velmi malá [23].

### 2.3.4 *Využití*

UV-VIS spektroskopie má pro kvalitativní analýzu omezené využití. Identifikace látek není možná přímo, naměřená spektra se musí porovnávat s knihovnou spekter. A ani shoda není dostatečná k přesnému určení látky. Tato metoda je vhodným doplňkem k IR a NMR spektroskopii.

Z pohledu kvantitativní analýzy je UV-VIS spektrofotometrie lépe využitelná. Při měření jsou snímána buď celá spektra, nebo jen absorbance při vhodné vlnové délce. Slouží k určení koncentrace pomocí Lambert-Beerova zákona. Zákon udává vztah mezi intenzitou dopadajícího a prošlého záření, délkou absorbující vrstvy a koncentrací měřeného vzorku. Matematicky lze absorbanci definovat jako:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (5)$$

kde  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient,  $c$  je koncentrace a  $l$  je optická dráha [19] [24].

### 2.3.5 *Kyselina pikrová*

Kyselina pikrová neboli trinitrofenol je světle žlutá krystalická látka, bez zápachu, málo rozpustná ve vodě. V praxi se vyrábí dvěma způsoby, nitrací 4-hydroxybenzen-1,3-disulfonové kyseliny nebo fenolu. Při zahřátí nad  $300^\circ\text{C}$  nebo iniciací rozbuškou snadno vybuchuje, proto je známá především využitím k výrobě trhavin. Mnohem citlivější na teplo, náraz nebo tření jsou soli kyseliny pikrové, pikráty. Kyselina pikrová se uplatňuje při výrobě barevného skla, v kožedělném průmyslu, jako mořidlo textilií, zastoupení má i v medicíně např. při stanovení kreatininu v séru. V analytické chemii se používá jako testovací činidlo, např. pro identifikaci alkaloidů, dále pro kolorimetrické stanovení hladiny cukru v krvi a při mikroanalýze uhlíkové oceli. V UV-VIS spektroskopii je stanovení látek založeno na vzniku žluto-oranžového komplexu, kdy intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci stanovované látky ve vzorku [27].

## 2.4 Membránové separační metody

Membránové procesy jsou separační techniky, které umožňují průchod malých molekul přes polopropustné membrány, ale zároveň zamezí propuštění makromolekulárních látek. Mezi membránové metody je řazena membránová filtrace, dialýza a reverzní osmóza. Tyto techniky nemají velkou rozlišovací schopnost, ale jsou velmi účinné v počátečním dělení směsí, například při separaci biopolymerů [28].

### 2.4.1 Princip

Membránové separační procesy se užívají k dělení homogenních nebo heterogenních tekutých směsí jako jsou kapalné roztoky a směsi, plynné směsi a suspenze v kapalinách s velikostí pevných částic menších než  $1 \cdot 10^{-5}$  m. U membránových separačních procesů se oddělování směsí uskutečňuje pomocí selektivně propustných pevných přepážek, tzv. separačních membrán. Působením hybných sil (např. tlakovým či koncentračním rozdílem) prochází přes membránu některé nebo všechny složky dělené směsi membránového systému a vzniká nová směs. Takto je vytvořen jeden z produktů membránového dělení, tzv. permeát. Zbytek směsi, který neprošel přes membránu je druhým produktem a je označován jako retentát.

Při dělicím procesu mohou nastat dva případy dělení. V prvním případě do membrány vstoupí všechny složky dělené směsi a během procesu membránou bez výjimky projdou. Rychlosti jejich permeace jsou ale rozdílné. V druhém případě membránou projdou jen některé složky. Zbývající jsou zadrženy membránou na vstupu dělené směsi. V tomto případě se jedná především o membránové filtrace suspenzí pevných částic, kdy membránou projde pouze tekutá fáze.

Díky zadržení některých složek na povrchu membrány a díky rozdílným rychlostem permeace složek přes membránu dochází u permeátu a retentátu ke vzniku rozdílného složení [29].

### 2.4.2 Dialýza

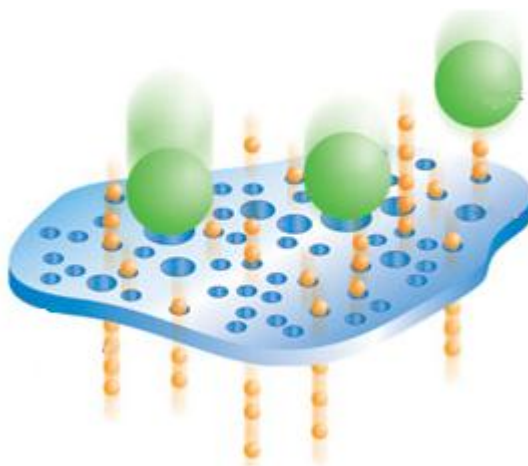
Dialýza je fyzikální proces, který spočívá v difuzním toku jedné nebo více rozpuštěných látek přes polopropustnou membránu. Přes póry membrány mohou volně difundovat jen molekuly menších rozměrů než je průměr pórů. Větší molekuly zůstávají uvnitř membrány [30].

Neporézní membránou jsou odděleny dva roztoky s odlišnou koncentrací nebo čisté rozpouštědlo od roztoku. Nízkomolekulární látky rozpuštěné v koncentrovaném roztoku difundují membránou do roztoku s nižší koncentrací, tedy ve směru koncentračního spádu. Hnací silou difúze je snaha získat rovnováhu v celém objemu roztoku. V okamžiku, kdy dojde k vyrovnání koncentrací látek procházejících membránou na obou stranách membrány, proces se zastaví.

V minulosti se k přípravě membrán využívalo kolodium, celofán, pergamen a velmi často i různé části zvířat, například střeva, vaječná blanka či různé měchýře. Dnes jsou již komerčně dostupné umělé membrány. Většinou se jedná o dlouhé trubice s různým průměrem a vhodnou velikostí pórů, které jsou často označovány jako dialyzační střeva [28].

Dialýza se běžně využívá k odstranění nízkomolekulárních nečistot z roztoku vysokomolekulární látky či ke změně roztokových vlastností. Příkladem může být čištění nukleových kyselin, zbavování proteinů solí (vysolování bílkovin síranem amonným), krystalizace bílkovin. Uspořádání dialyzačního systému může být vsádkové nebo kontinuální.





Obr. 13: Prostup molekul membránou [31]

Hybnou silou dialýzy je rozdíl koncentrací rozpuštěné složky na obou stranách membrány. Intenzita látkového toku dialyzační membránou rozpuštěné složky (B) je vyjadřována vztahem:

$$J_B = \frac{D_B K_B}{\delta_M} (c_{B,rs} - c_{B,ps}), \quad (6)$$

kde  $D_B$  je difuzivita složky B v membráně,  $K_B$  rozdělovací (rovnovážný) koeficient složky B mezi roztokem a materiálem membrány. Členy rovnice  $c_{B,rs}$  a  $c_{B,ps}$  vyjadřují molární koncentrace složky B v roztoku těsně u retentátového a permeátového povrchu membrány [29].

V důsledku nízké intenzity promíchávání retentátového i permeátového roztoku se při dialýze obvykle uplatňují odpory proti přestupu hmoty v kapalných filmech, které přiléhají na povrch membrán. Celkový odpor proti prostupu rozpuštěné složky z více do méně koncentrovaného roztoku je pak dán vztahem:

$$R_{celk} = \frac{\delta_M}{D_B K_B} + \frac{1}{k_{rs}} + \frac{1}{k_{ps}}, \quad (7)$$

kde  $k_{rs}$  a  $k_{ps}$  jsou součinitele přestupu hmoty mezi roztokem a povrchem membrány na retentátové i permeátové straně membrány. Intenzita látkového toku složky B membránou je následně vyjádřena vztahem:

$$J_B = \frac{c_{B,rs} - c_{B,ps}}{R_{celk}}, \quad (8)$$

kde je předpokládáno konstantní složení roztoků podél obou povrchů membrány. Ve vsádkovém systému se s delší dobou trvání dialýzy k sobě přiblíží koncentrace permeující složky v retentátu a permeátu, proto hodnota klesá  $J_B$  klesá [29].

#### 2.4.2.1 Faktory ovlivňující rychlost dialýzy

Rychlost dialýzy je ovlivněna několika faktory, které ovlivní pohyb molekul. Důležitým faktorem je teplota, počet a velikost pórů v membráně, síla a velikost plochy membrány, vztahy mezi membránou a difundujícími částicemi. Proces urychluje míchání systému a výměna kapaliny vně membrány.

Teplota má vliv na termodynamiku a zvýšení teploty zrychlí šíření molekul. Proto bude dialýza probíhat rychleji při laboratorní teplotě, než při teplotách mírně nad 0 °C. Při výběru



teploty musí být uvážena tepelná stabilita látek dané směsi. Rychlost difúze je přímo úměrná koncentraci a zároveň nepřímo úměrná molekulové hmotnosti. Se zvyšující se koncentrací je v roztoku více molekul a zvyšuje se pravděpodobnost přechodu molekul na druhou stranu membrány. Závisí tedy na koncentračním spádu, který se odvíjí od poměru objemů vně a uvnitř membrány. S rostoucí molekulární hmotností rychlost pohybu molekul v roztoku klesá a zároveň se snižuje možnost difuze látek přes membránu. A to i v případě, že molekula má dostatečně malý rozměr, aby mohla póry projít.

Rychlost dialýzy je také přímo úměrná povrchu membrány a nepřímo úměrná její tloušťce. Běžně používané membrány pro laboratorní dialyzační aplikace jsou tenké 12 až 30  $\mu\text{m}$ . Poskytují tak dobrou rychlost difúze a strukturální integritu. Tloušťka membrány většinou není proměnná, ale velikost povrchu lze celkem snadno modifikovat. Čím bude plocha povrchu membrány větší a celkově bude dialyzační membrána tenčí, tím bude dialýza rychlejší. Všechny molekuly vzorku totiž budou blíže k membráně a velká část z nich v přímém kontaktu s membránou, což způsobí rychlejší přestup látek.

Průměrná nebo maximální velikost pórů dialyzační membrány určuje, jaká největší velikost molekul může difundovat přes membránu. Membrány jsou označovány písmeny MWCO (Molecular Weight Cut Off). Tato hodnota udává nejmenší průměrnou molekulovou hmotnost molekuly, která nebude účinně přestupovat přes membránu a z 90 % bude zachována uvnitř membrány. Pokud má tedy membrána označení 10 K MWCO, uvnitř membrány zůstanou molekuly s molekulovou hmotností alespoň 10 kDa a více. MWCO ale není ostrá mez toho, jaké molekuly membránou přesně projdou. Difúze molekul s velikostí v blízkosti MWCO bude o dost pomalejší ve srovnání s molekulami podstatně menšími než je MWCO. Na maximální velikost molekul, které membránou projdou, má vliv i materiál, ze kterého je membrána vyrobena. Například dialyzační membrány z regenerované celulózy obsahují širokou škálu velikostí pórů a je prakticky nemožné dosáhnout 100% zachování i velmi velkých molekul [32].

Proces dialýzy urychluje míchání systému. Během přestupu nízkomolekulárních sloučenin přes póry se na vnější straně membrány může tvořit mikroprostředí, tzv. Nernstova difúzní vrstva. V této vrstvě, která je přibližně 200 až 300 molekul tlustá, jsou nízkomolekulární sloučeniny ve vyšší koncentraci ve vztahu ke zbytku dialyzátu (permeátu). Tato vysoká lokální koncentrace molekul způsobí zpomalení procesu dialýzy. A to proto, že molekuly mohou póry náhodně znovu vstoupit do dialyzační membrány a vrátit se tak ke vzorku, nebo se systém jeví jako rovnovážný, což dialýzu také zpomalí, až zastaví. Míchání systému účinně rozbije mikroprostředí Nernstovy vrstvy a pomáhá udržovat rozdíl koncentrací potřebných k difúznímu procesu [32] [33].

Dialýza je obvykle nejrychlejší na počátku a postupně se zpomaluje. Vždy je snahou, aby byl proces co nejrychlejší.

### 2.4.3 Typy membrán

Membrány se obecně třídí do několika skupin podle různých hledisek. Jedná se o původ, skupenství, materiál, strukturu a případně morfologii. V dnešní době jsou membrány většinou syntetického původu. Biologické membrány by díky svým vlastnostem mohly být v průmyslu velmi dobře uplatněny, ale jejich chemické a mechanické vlastnosti to nedovolí. Výjimkou jsou dialyzační střeva biologického původu. Syntetické membrány jsou vytvořeny tak, že mají plně vyhovující chemické, fyzikálně-chemické i mechanické vlastnosti a navíc mohou být přímo uzpůsobeny podmínkám, ve kterých budou používány. Z hlediska skupenství existují

kapalné a pevné membrány. V průmyslu se nejčastěji používají pevné, které mají dobré mechanické i separační vlastnosti. Navíc jejich vlastnosti mohou být v širokém rozsahu upravovány změnami vnitřních struktur membrán. Dialyzační membrány jsou vyráběny z organických polymerů, přírodních nebo syntetických. Chemické složení lze modifikovat a tak opět lehce měnit dělicí a mechanické vlastnosti membrán. Ve srovnání s anorganickými membránami, které jsou velmi odolné proti vysokým tlakovým rozdílům a obvykle odolávají i vysokým teplotám, se organické membrány vyznačují mnohem menší odolností proti těmto vlivům. Výhodou je snadná tvarovatelnost. Různým způsobem výroby lze u membrán vytvořit odlišnou vnitřní mikrostrukturu, a to porézní nebo neporézní. Porézní membrány jsou tvořeny póry ústící oběma konci na povrch. Dělicí schopnost je určena velikostí pórů, neboť jejich průměr je tak velký, že umožní konvektivní tok tekutin membránou. Na dělicí schopnost nemá složení materiálu vliv. U membrán s neporézní strukturou jsou dělené složky přes membránu transportovány difuzí, vlastnosti materiálu membrány mají na dělení složek zásadní vliv. Pro dialýzu jsou dnes nejčastěji používány syntetické, pevné, organické, neporézní membrány [33].

Pro laboratorní dialýzu jsou nejčastěji používány membrány vyrobené z regenerované celulózy. Při výrobě se membrána vytlačuje z rozpuštěné celulózy jako list či trubice a následně se vysuší. Často je přidáván glycerol jako stabilizátor vlhkosti, který zabrání vzniku trhlin při sušení a přispívá k zachování požadované struktury pórů. Póry mají standardně velikost 15 až 50 nm a MWCO se pohybuje v rozmezí 0,1–1000 kDa. Struktura pórů je symetrická a molekuly přes ně mohou migrovat v obou směrech [32].

#### **2.4.4 Vlastnosti membrán**

Nejdůležitějšími vlastnostmi separačních membrán je permeabilita, selektivita a rejekční faktor. Permeabilita membrány neboli prostupnost složek dělených směsí je definována jako tok složky jednotkovou plochou membrány při jednotkové hybné síle přes jednotkovou tloušťku membrány. Přičemž tok složky membránou může být tokem látkovým, hmotnostním nebo objemovým podle druhu membránového procesu. Schopnost oddělovat složky dělených směsí je vyjádřena selektivitou. Rejekční faktor udává míru zadržení složky u vstupního povrchu membrány, což při charakterizaci molární hmotností znamená, že membrána propouští všechny složky s molární hmotností nižší než je daná hodnota rejekčního faktoru [29].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Za posledních 30 let bylo sestaveno a prozkoumáno mnoho polymerních systémů, které by mohly najít využití v lékařství. V dnešní době se jako jedna z nejlepších látek vhodná k použití ukázala kyselina hyaluronová. Je biologicky odbouratelná, netoxická, neimunogenní a protizánětlivá. Výzkum této kyseliny se provádí především v oblasti cílených nosičů léčiv s prodlouženým uvolňováním. Kyselina hyaluronová a její deriváty jsou předmětem mnoha studií, ať ve formě částic, či hydrogelu. Pro cílené nosiče léčiv je významná vysoká afinita HyA na receptor CD44 [34].

Výzkumem léčiv proti rakovině se specifickým cílením se zabývalo již mnoho vědeckých skupin. HyA je jednou z hlavních složek extracelulární matrix a hlavním ligandem pro receptory CD44 a RHAMM, které se nadměrně vyskytují u různých rakovinou postižených buněčných povrchů [35]. Z tohoto důvodu může být lék proti rakovině s cíleným doručením do nádorové buňky vytvořen spojením HyA a příslušného léčiva, kdy HyA bude vychytávána receptory [36]. Spojení léčiva a HyA může poskytovat mnoho výhod jako je rozpouštění, solubilizace, lokalizace a řízené uvolňování léčiv [37]. V závislosti na stupni substituce kyseliny hyaluronové léčivou látkou vykazují tyto konjugáty, v porovnání s obvyklými léky, lepší schopnost nádorového cílení a vyšší terapeutický účinek. Z HyA byly vyvinuty liposomy, které mohou obsahovat léčivo a cíleně jej transportovat do nádorové buňky díky receptoru CD44 [38]. Zároveň také byly objeveny amfifilní deriváty HyA, které jsou schopny tvořit nanočástice a sloužit tak jako nosiče léčiv. Systém se skládal z hydrofobně modifikovaného derivátu HyA a kyseliny 5 $\beta$ -cholové. Hydrofobní jádro nanočástic slouží pro zapouzdření protirakovinových léčiv [39]. Velmi využívaným léčivem v kombinaci s kyselinou hyaluronovou je protinádorové léčivo doxorubicin či paclitaxel. *Upadhyay a spol.* zkoumali amfifilní polypeptid-blok-polysacharidové kopolymery založené na liposomální struktuře s připojeným doxorubicinem (DOX). Studie byla provedena in vitro na rakovinových buňkách s vyšším a nižším množstvím receptorů CD44. Do liposomů byl DOX vložen nanoprecipitací a k jeho potupnému uvolňování docházelo až 10 dnů při pH 5,5-7,4. Bylo dokázáno, že vytvořený systém je přitahován k receptorům CD44 na rakovinových buňkách. Tento systém tedy může být použit jako samostatný cílený nosič léčiv u rakoviny prsu při vyšším množství receptoru CD44 na rakovinou postižených buňkách [40].

Zajímavý objev v oblasti cílení léčiv učinili *Oyarzun-Ampuero a spol.* v červenci 2013 [41]. Vytvořili nové lékové nosiče pro intracelulární dopravu hydrofobních protinádorových léčiv, nazvané hyaluronové nanokapsle. Tyto nanokapsle jsou složeny z lipidového jádra a skořepiny tvořené kyselinou hyaluronovou. Kationtové povrchově aktivní látky (CTAB) tvoří mezifázový můstek mezi jádrem a skořepinou. Jsou jednoduché na přípravu, nedochází k tvorbě kovalentní vazby a díky hydrofobnímu jádru jsou schopné zapouzdřit léčivo docetaxel. Díky HyA hydrofilní vrstvě mají schopnost interagovat s nádorovými buňkami NCI-H460 a zlepšit tak farmakologický účinek léčiva. Výsledná velikost nanokapslí dosahuje rozměrů okolo 200 nm, je kulovitého tvaru a celý systém má záporný zeta potenciál. Zajímavým zjištěním týmu také bylo, že nanokapsle byly během skladování při teplotách 4 °C a 37 °C, po tři měsíce téměř shodně stabilní. Navíc je možné tento systém přeměnit lyofilizací na prášek.

Cílem skupiny *Yang a spol.* bylo vyvinout nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) léčiv potažené kyselinou hyaluronovou [42]. Systémy jsou založené na elektrostatických přitažlivých silách. Jako léčivá látka byl použit paclitaxel (PTX). Při přípravě systému byl

nejdříve spojen paclitaxel s lipidovým nosičem za pomoci CTAB. Následně byl PTX-NLC potažen kyselinou hyaluronovou. Uvolňování PTX ze systému bylo *in vitro* zkoumáno metodou dialýzy. Tato analýza ukázala, že PTX je z HyA-NLC uvolňován pomaleji než z protinádorového chemoterapeutického léčiva Taxol®. Výsledky testů na cytotoxicitu prokázaly, že i v tomto směru má systém HyA-NLC lepší výsledky než Taxol®. Navíc, při *in vivo* testech, byl nově připravený systém pacienty lépe snášen. Kromě toho, může systém HyA-NLC nesoucí PTX v krvi déle cirkulovat a jen postupně zvyšovat obsah PTX v nádorových buňkách.

**Barbault-Foucher a spol.** založili svoji studii na návrhu nového systému očního cíleného transportu léčiv [43]. Hlavní náplní bylo prozkoumat interakce mezi poly- $\epsilon$ -kaprolaktanem (PCL), kyselinou hyaluronovou a benzalkonium chloridem (BKC) a spojit prodlouženou dobu účinku léčiva a snadnou aplikaci systému. Dosažené výsledky ukázaly, že HyA je připojena na kladně nabitým povrchu PCL díky přítomnosti kationtových povrchově aktivních látek a systém vykazuje určitou stabilitu.

**Yanhua Liu, Jin Sun a spol.** provedli výzkum s nedávno vyvinutým derivátem kyseliny hyaluronové HyA-C18 [44]. S kyselinou listovou byl vytvořen systém s hydrofobními jádry pro zabudování léčiva PTX. Fyzikální vlastnosti micel byly měřeny pomocí DLS, TEM a DSC. Uvolňování léčiva ze systému bylo zkoumáno pomocí dialýzy. Jako okolní médium byl použit solný fosfátový pufr s pH=7,4, který byl zahřát na 37 °C a promícháván. Výsledky ukázaly, že takto připravený systém má vynikající vlastnosti vyznačující se malou velikostí částic, kvalitním zapouzdřením, prodlouženým uvolňováním léčiva, dvojí možností cílení a výbornou kumulací u nádorových buněk.

**Wen Guo a spol.** zkoumali interakce tenzidů a polyelektrolytů [45]. Zjistili, že tenzidy mohou za velmi nízkých termodynamických aktivit tvořit s opačně nabitými polyelektrolyty komplexy. Tento fakt může být využit při separaci (ultrafiltraci) koloidů. Pro studium byl použit PDMDAAC (poly(dimethyldiallylammonium chloride)) a SDS (sodium poly(styrenesulfonate)). Byla provedena solubilizace, ultrafiltrace a dialýza roztoku samotného tenzidu a roztoku polymer-tenzid za přítomnosti 20mM chloridu sodného a bez něj.

**Wurster a Werawatganone** provedli studii chování neionogenního polymeru, hydroxypropylmethyl celulosy (HPMC) s kationktivním tenzidem, CTAB [46]. Jako vhodná metoda přesného měření interakcí HPMC-CTAB byla zvolena rovnovážná dialýza. Výsledky ukázaly, že mezi CTAB a HPMC existují určité interakce. Bez přítomnosti polymeru byly koncentrace v membráně a v okolním roztoku po určité době vyrovnané. Za přítomnosti různých stupňů HPMC o koncentraci 0,02 % měly poměry konečných koncentrací uvnitř a vně membrány hodnotu okolo dvou. Vyšší koncentrace polymeru způsobila ještě pomalejší dialýzu. Pomocí dialýzy byly jasně dokázány i interakce mezi CTAB a HPMC. Se zvyšující se polymerací HPMC se zvyšuje počet molů CTAB vázaných na polymer. Při studiu vlivu koncentrace na interakce mezi polymerem a CTAB bylo zjištěno, že při nízkých koncentracích je molární poměr konstantní a při vyšší koncentraci se snižuje. Z toho vyplývá, že tenzid je na molekulu vázán podél centrálního řetězce a ne na koncové skupiny polymeru.

Dialýzu ve své práci **Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers** použili i **Jones a Leroux** [47]. V této studii byla dialýza především použita pro tvorbu micel. Bylo prokázáno, že micely PEO-PBLA, připravené rozpuštěním kopolymeru v DMF a následně vytvořené pomocí dialýzy, mohou být větší než micely připravené pouze ve vodě. Dále byla dialýza použita pro fyzikální zachycení léčiv do micel. Dialyzační metoda se skládá

z přenesení léčiva a kopolymeru z rozpouštědla, kde jsou obě látky rozpustné (např. ethanol), do jiného rozpouštědla, které je selektivní pouze pro hydrofilní části polymeru (např. voda). Tím se začne tvořit micelární jádro, do kterého se během procesu uzavře nerozpustné léčivo.

**Zambito a spol.** studovali uvolňování léčiv z nanočásticových systémů pomocí dialýzy [48]. Systém byl složen z diclofenacu nebo ofloxacinu připojeném na chitosan. Dialýza systému byla provedena s léčivem a bez něj v roztoku rozpuštěného chitosanu s HCl. Zároveň byl prováděn pokus pomocí ultracentrifugy. Srovnáním naměřených dat bylo ukázáno, že na hodnoty dialyzační metody musí být pohlíženo velmi kriticky, jinak jsou výsledky velmi zavádějící.

Kromě práce od Wurster a Werawatganona se využitím metod rovnovážné dialýzy a UV spektroskopie zabýval i **Varghese a spol.** [49]. Dialýzou byly studovány vazby mezi izomery kyseliny retinové (isotretinoin a tretinoin) a léčivy, kdy byly vybrány amlodipin a telmisartan. V práci byly shrnuty výsledky výzkumu volných frakcí léčiv a léčiv vázaných ve směsi hovězího sérového albuminu. Studie in vitro ukázala, že lepších výsledků je dosaženo pro isotretinoin přičemž amlodipin zvyšuje koncentraci volného léčiva o 5 %, a telmisartan přibližně o 2 %.

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný	Contipro Biotech s.r.o. M=458 kDa Batch No: 213-3809 Expire: 20150219
Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB)	Sigma Aldrich; čistota ~ 99 % $C_{19}H_{42}BrN$ M=364,46 g·mol <sup>-1</sup> CAS: 57-09-0
Kyselina pikrová	Sigma Aldrich; čistota ≥ 98 % $C_6H_3N_3O_7$ M=229,1 g·mol <sup>-1</sup> CAS: 88-89-1
Chloroform	Sigma Aldrich; čistota ~ 99,84 % $CHCl_3$ M=119,38 g·mol <sup>-1</sup> CAS: 67-66-3
Chlorid sodný	Merci s.r.o.; čistota ~ 99,5 % NaCl M=58,44 g·mol <sup>-1</sup> CAS: 7647-14-5

### 4.2 Příprava zásobních roztoků

Pro přípravu všech zásobních roztoků i vzorků byla použita voda typu ELGA ze systému Purlab.

#### 4.2.1 Zásobní roztok hyaluronanu

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství hyaluronanu a doplněno vodou na výsledný objem. Pro lepší rozpuštění navážky byla zásobní lahev umístěna na magnetickou míchačku. Byl připraven zásobní roztok hyaluronanu o molekulové hmotnosti 458 kDa s koncentrací 1 g·dm<sup>-3</sup>, který byl uchováván v chladícím zařízení při maximální teplotě 5 °C.

#### 4.2.2 Zásobní roztok CTAB

Potřebné množství CTAB bylo naváženo na analytických vahách a rozpuštěno v části konečného objemu vody. Pro lepší rozpuštění byla směs umístěna na magnetickou míchačku a mírně zahřívána. Po rozpuštění byl roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn po rysku na požadovaný (výsledný) objem. Připravený roztok byl uchován při

laboratorní teplotě. Zásobní roztok byl připraven s koncentrací  $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , který byl dle potřeby dále ředěn na roztoky o koncentraci  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Stejným způsobem byl připraven i roztok CTAB ( $c=5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v NaCl. Voda byla nahrazena roztokem NaCl o koncentraci  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

#### **4.2.3 Zásobní roztok $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl**

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství NaCl. Látka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky. Baňka byla doplněna vodou po rysku a důkladně promíchána. Připravený roztok byl uchován při laboratorní teplotě.

#### **4.2.4 Zásobní roztok 0,01% kyseliny pikrové v chloroformu**

Do zcela suché zásobní lahve bylo na analytických vahách naváženo vypočtené množství kyseliny pikrové. Práce byla vždy prováděna v rukavicích a s ochrannými brýlemi. Kyselina pikrová musí být uchovávána z důvodu nebezpečí výbuchu pod vodou, proto byl odběr navážky prováděn co nejvíce ze spodní části zásobní nádoby, aby došlo k odběru látky. Pro zásobní lahev o objemu 100 ml nesměla být přesažena hmotnost navážky 0,03 g  $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ , aby bylo možné kyselinu pikrovou rozpustit v potřebném množství rozpouštědla. Kyselina pikrová byla doplněna úměrně vypočteným množstvím chloroformu a výsledný roztok byl dobře promíchán.

### **4.3 Příprava vzorků**

#### **4.3.1 Příprava vzorků CTAB ve vodě a v NaCl**

Byla připravena vhodná koncentrační řada, která obsahovala minimálně 4 vzorky. Do předem označených vialek bylo napipetováno různé množství zásobního roztoku CTAB o koncentraci  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a doplněno vodou na výsledný objem  $5 \text{ cm}^3$ . Vzorky byly umístěny na třepačku a míchány alespoň 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl proveden další postup (viz kapitola 4.4).

#### **4.3.2 Příprava vzorků CTAB+ HyA ve vodě a v NaCl**

Pro přípravu vzorků s hyaluronanem byl použit analogický postup jako u CTAB. Zásobní roztok hyaluronanu o koncentraci  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl do vialek pipetován jako první tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 1, 5, nebo  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Konečný objem vzorků musel být  $5 \text{ cm}^3$ . Vzorky byly umístěny na třepačku a míchány alespoň 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl proveden další postup (viz kapitola 4.4).

#### **4.3.3 Příprava roztoků CTAB pro ověření metodiky**

Pro ověření metodiky Mahrousovy metody [46] byla vybrána koncentrace CTAB  $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Do čistých suchých vialek bylo napipetováno 40  $\mu\text{l}$  nebo 600  $\mu\text{l}$  CTAB a doplněno vodou na výsledný objem  $5 \text{ cm}^3$ . Roztoky byly promíchány na třepačce typu vortex a využity pro dané experimenty.

#### **4.3.4 Příprava vzorků CTAB a CTAB+HyA ve vodě a v NaCl pro dialýzu**

Pro přípravu vzorků pro dialýzu byl opět použit analogický postup přípravy vzorků CTAB nebo CTAB s HyA ve vodě či NaCl. Výsledný objem roztoků byl  $11 \text{ cm}^3$ , proto aby následně mohlo být  $10 \text{ cm}^3$  převedeno do dialyzační membrány.

#### 4.4 Modifikovaná Mahrousova metoda přípravy vzorků pro měření

Postup metody byl nastudován dle práce Wurster a Werwatganone [46]. Veškerá práce byla prováděna v digestoři v ochranných rukavicích a brýlích. Do zcela suché označené zkumavky byly pomocí automatické pipety napipetovány  $4\text{ cm}^3$  vzorku a dále přidáno  $8\text{ cm}^3$  0,01% roztoku kyseliny pikrové v chloroformu. Zkumavka byla ihned uzavřena zátkou opatřenou teflonovou páskou. Zkumavka byla 1 minutu intenzivně protřepávána a následně přibližně 2 minuty ponechána v klidu pro dobré oddělení fází. Pomocí pipety o objemu 5 ml byla odebrána horní (vodná) fáze systému. Následně byla dolní (chloroformová) fáze přefiltrována přes filtrační papír za normálního tlaku. První  $1\text{--}2\text{ cm}^3$  filtrátu byly odebrány do připravené odpadní kádinky a zlikvidovány. Zbýlý roztok byl filtrován do označené vialky a ihned uzavřen. Takto připravený vzorek byl proměřen na UV-VIS spektrofotometru.

Pro ověření metodiky Mahrousovy metody byly obměňovány různé části tohoto postupu. Jednalo se o způsob a délku třepání vzorků, vliv koncentrace kyseliny pikrové a poměr pipetovaného vzorku a kyseliny pikrové.

##### 4.4.1 Příprava vzorků pro ověření vlivu délky a způsobu třepání vzorků

Převod  $0,15\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  CTAB z vodného roztoku do chloroformu byl proveden ručně nebo ultrazvukem. Vzorky třepané ručně byly připraveny třemi způsoby. První zkumavka byla protřepána celkem desetkrát, druhá byla třepána velmi intenzivně po dobu 30 sekund, třetí byla třepána velmi intenzivně po dobu 60 sekund. Čtvrtý vzorek byl vložen na 2 minuty do ultrazvuku od firmy BANDELIN typu SONOREX DIGITEC.

##### 4.4.2 Příprava vzorků pro ověření vlivu koncentrace kyseliny pikrové

Pro tento experiment byly připraveny různé zásobní roztoky kyseliny pikrové (0,01% a méně a více koncentrovaný než 0,01%). Na analytických vahách bylo naváženo přibližně poloviční a dvojnásobné množství standardně navažovaného množství. Všechny navážky byly doplněny stejným množstvím chloroformu odpovídající naváženému množství  $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$  pro 0,01% roztok. Přesná koncentrace byla následně dopočítána na výsledné koncentrace 0,004 % a 0,022 %  $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$  v chloroformu.

##### 4.4.3 Příprava vzorků pro ověření vlivu přesného objemu kyseliny pikrové

Do čistých suchých zkumavek bylo pipetováno  $4\text{ cm}^3$   $0,15\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  vzorku CTAB a dále jednotlivě 7, 8 nebo  $9\text{ cm}^3$  0,01% roztoku kyseliny pikrové v chloroformu. Výsledné poměry (vzorek CTAB:kys.pikrová v chloroformu) byly 4:7, 4:8 (1:2) a 4:9.

#### 4.5 Dialýza

Pro dialýzu byly použity dialyzační soupravy D-Tube™ Dialyzer Mega firmy Merck s MWCO 3,5 kDa a objemem  $15\text{ cm}^3$ . Před provedením samotné dialýzy byla membrána ponechána deset minut ve vodě typu ELGA ze systému Purlab, aby se předem hydratovala. Poté byla vložena do kádinky se  $65\text{ cm}^3$  čisté vody. Do vnitřního prostoru bylo převedeno  $10\text{ cm}^3$  předem připraveného vzorku (CTAB, CTAB+HyA  $10\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Takto připravené systémy byly při laboratorní teplotě ponechány dialyzovat (obr. 14). Doba trvání dialýzy byla závislá od typu daného experimentu. Po uplynutí stanovené doby bylo z vnitřního prostoru membrány a i z kádinky pipetováno  $4\text{ cm}^3$  vzorku do připravených označených zkumavek. Tyto vzorky byly stanoveny podle modifikované Mahrousovy metody (viz kapitola 4.4).

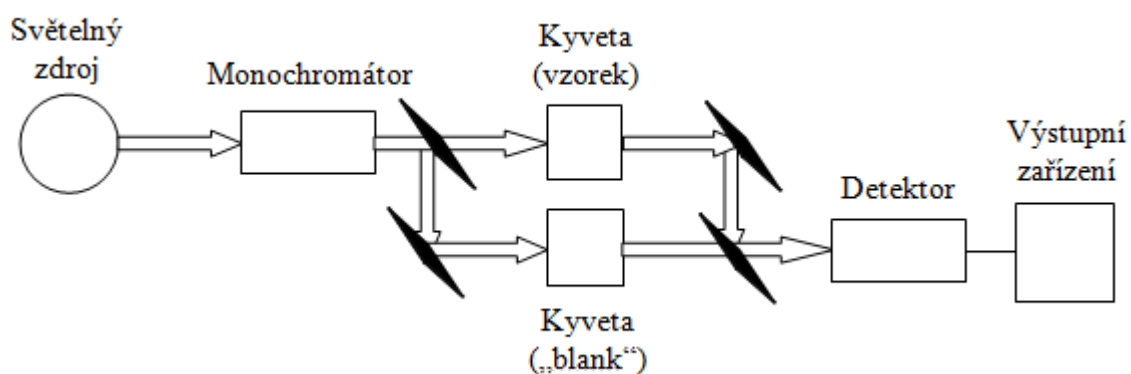




*Obr. 14: Dialyzační membrána v kádince*

#### 4.6 Měření

Pro proměření vlastností vzorků připravených modifikovanou Mahrousovou metodou byla vybrána absorpční spektroskopie. Absorpční vlastnosti vzorků byly proměřeny na UV-VIS spektrofotometru HITACHI U-3900H. Přístroj HITACHI U-3900H je dvoupaprskový spektrofotometr (obr. 15). U takových spektrofotometrů jsou při měření snímány dvě kyvety, kdy v jedné je čisté rozpouštědlo a ve druhé měřený vzorek. Světlo je emitováno z WI lampy pro viditelné vlnové délky a z D<sub>2</sub> lampy pro UV rozmezí. Monochromatické světlo je rozděleno na dva svazky pomocí rotačního zrcadla. Po průchodu paprsku vzorkem dopadá světlo na detektory. Měřením získáme absorpční spektrum.



*Obr. 15: Schéma dvoupaprskového spektrofotometru*

U všech vzorků bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 300–700 nm. Jako pozadí (blank) byl použit čistý chloroform. Jako detekční vlnová délka byla zvolena hodnota 415,5 nm [46].

## 4.7 Statistika

Všechny experimenty a k nim odpovídající vzorky byly provedeny vždy minimálně třikrát. Díky tomu jsou výsledné závislosti v grafech této práce průměrem všech měření na daných vzorcích a u jednotlivých bodů mohla být pomocí funkce SMODCH.VÝBĚR v programu MS EXCEL stanovena směrodatná odchylka. Přesnost kalibrační křivky byla vypočítána jako rozptyl hodnot závisle proměnných kolem regresní přímky, který charakterizuje směrodatná odchylka  $s_{y,x}$  a je dána vztahem:

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left( \sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i \right)} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n-2}} \quad (9)$$

kde  $Y_i$  je hodnota vypočtená z regresní rovnice (10) pro odpovídající  $x_i$ .

$$y = bx + a \quad (10)$$

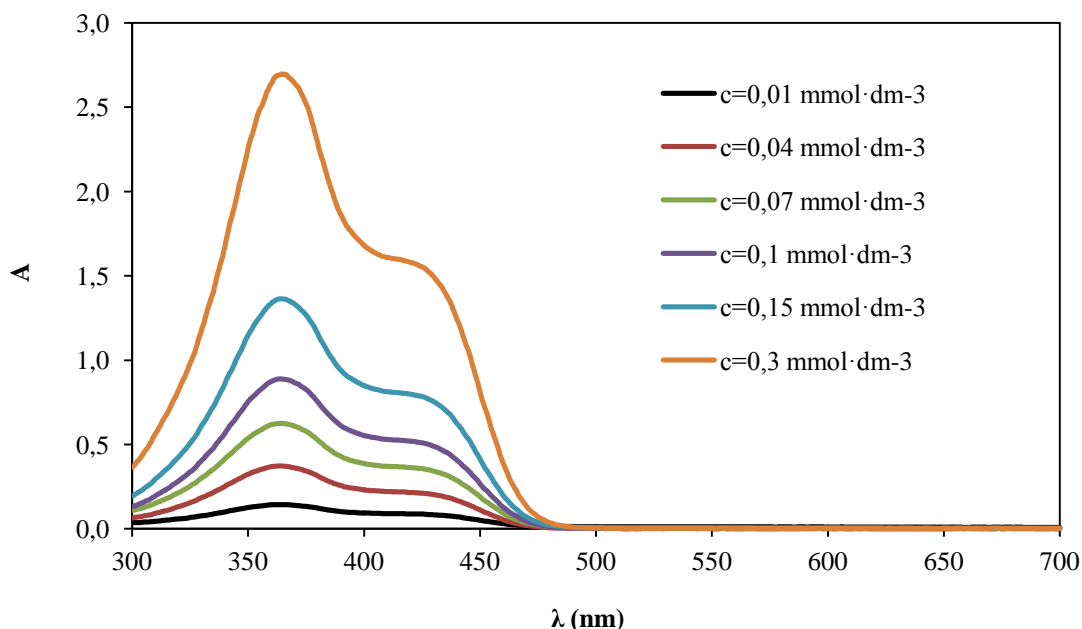
K směrodatným odchylkám měření byla připočtena i směrodatná odchylka kalibrační křivky a celkové chyby byly v grafech znázorněny jako chybové úsečky.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce je prozkoumat, naučit se a zavést do praxe modifikovanou Mahrousovu metodu a rovnovážnou dialýzu. A to za účelem bližšího poznání agregačního chování systému amfifilní látka-polymer, kde byl jako tenzid vybrán CTAB a zástupcem polyelektrolytů je hyaluronan.

### 5.1 Kalibrační křivky

Pro popis a možnost stanovení výsledků dalších naměřených dat byly sestaveny kalibrační křivky. Obrázek (obr. 16) zobrazuje absorpční spektrum koncentrační řady CTAB v komplexu s kyselinou pikrovou vyextrahovaného do chloroformu. Z naměřených hodnot je lehce patrné, že se zvyšující se koncentrací tenzidu stoupá absorbance, jak vyplývá z Lambert-Beerova zákona. Maximum absorpčního spektra vzorků se pohybuje okolo hodnot 360–364 nm. Pro další vyhodnocování naměřených dat byla použita vlnová délka 415,5 nm, kdy jsou absorbance nižší [46]. Díky tomu mohou být vyhodnoceny i vzorky s vyšší koncentrací. Pro dobrou interpretaci výsledků by absorbance vzorků při dané vlnové délce neměla přesáhnout rozmezí hodnot 0,1–0,9.



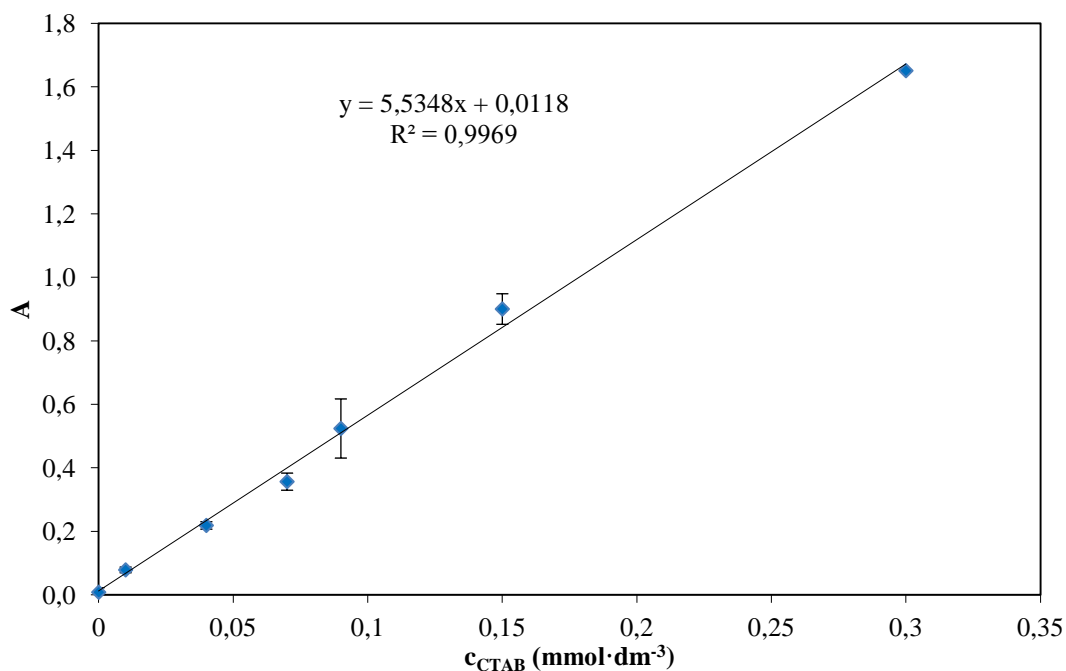
Obr. 16: Absorpční spektra komplexu kyselina pikrová-CTAB v chloroformu

#### 5.1.1 Kalibrační křivky

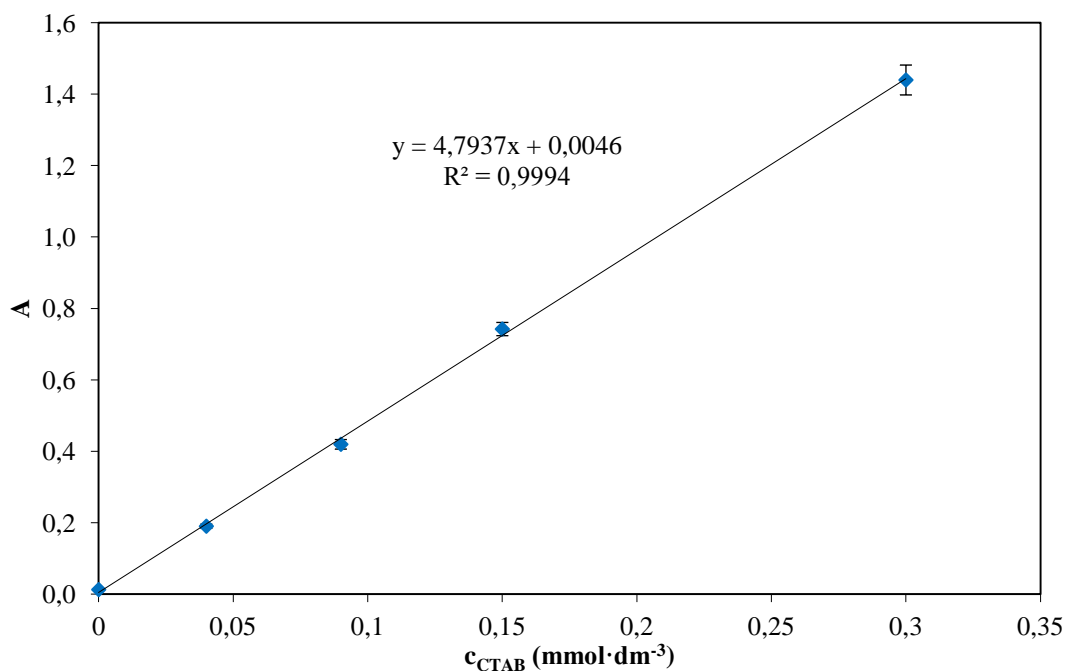
Pro popis a možnost stanovení vzorků byla sestavena koncentrační řada vzorků CTAB ve vodném prostředí a v prostředí fyziologické iontové síly (0,15 mol·dm<sup>-3</sup> NaCl). Vzorky byly připraveny s nízkou koncentrací CTAB, proto aby výsledná absorbance komplexu nebyla příliš vysoká a bylo ji tak možné změřit. Z naměřených dat byla vynesena závislost absorbance na koncentraci CTAB pro vlnovou délku 415,5 nm a byla tak získána kalibrační křivka (obr. 17, obr. 18). Body kalibrační křivky vykazují lineární závislost, čímž je potvrzeno Lambert-Beerovo pravidlo.

Z naměřených hodnot a z rovnic lineárních regresí křivek CTAB ve vodném prostředí a v prostředí NaCl je patrné, že se změnou rozpouštědla došlo ke snížení množství CTAB

v roztocích NaCl. Přítomnost soli zabrání vytvoření stejného počtu komplexů CTAB-kyselina pikrová oproti vodnému prostředí.



Obr. 17: Kalibrační křivka CTAB v  $H_2O$



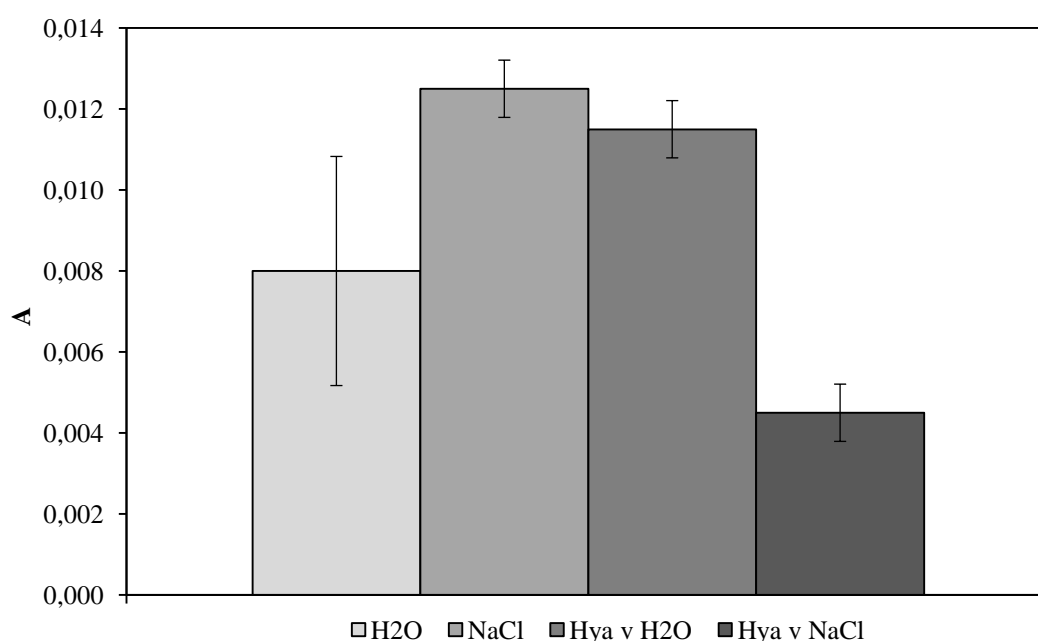
Obr. 18: Kalibrační křivka CTAB v NaCl

Ze získaných hodnot spolehlivosti rovnice regrese závislosti absorbance na koncentraci a chybových úseček je patrné, že Mahrousova metoda pro vyhodnocení koncentrací tenzidů je velice přesná, a proto byla použita i pro další práci.

## 5.2 Ověření metodiky

Pro reprodukovatelnost výsledků muselo být ověřeno několik rizik a faktorů, které mohou mít zásadní vliv na naměřené hodnoty absorbance. Především se jedná o vliv přesné koncentrace kyseliny pikrové, doby třepání vzorků, přesný objem kyseliny pikrové. Dále by mohla být stanovena doba pro oddělení fází po třepání. Z pozorování však bylo usouzeno, že k oddělení fází dochází velmi rychle a stačí jen čas, než se připraví pomůcky pro další část postupu převodu vzorků na měřitelnou formu. Pro kontrolu byla také proměřena absorbance rozpouštědel CTAB (voda a chlorid sodný), čistých a za přítomnosti hyaluronanu (obr. 19).

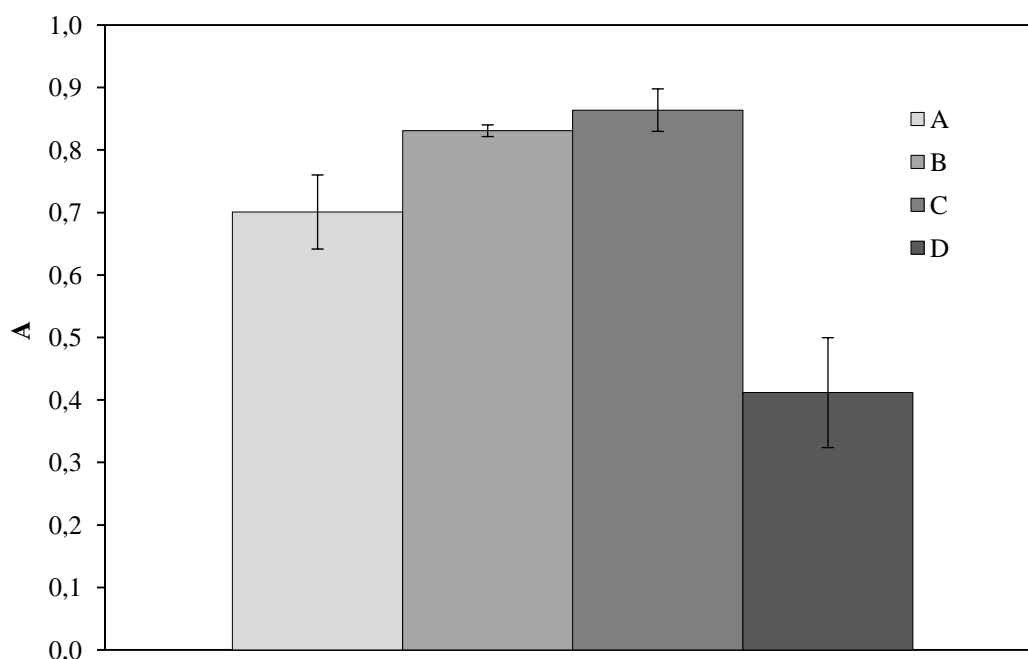
Z naměřených hodnot vyplývá, že absorbance čistých rozpouštědel a rozpouštědel za přítomnosti hyaluronanu vyextrahovaných s kyselinou pikrovou do chloroformu je velice nízká. V roztocích nedochází ke vzniku komplexů kyseliny pikrové s těmito látkami. Proto bude pro další měření vliv rozpouštědel na výsledné absorbance zanedbán.



Obr. 19: Absorbance čistých rozpouštědel a rozpouštědel s přísadkou Hya ( $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) bez přítomnosti CTAB extrahovaných do chloroformu s kyselinou pikrovou

### 5.2.1 Vliv délky a způsobu třepání vzorků

Pro studium vlivu délky třepání vzorků na výsledné hodnoty absorbance byl použit tenzid CTAB o koncentraci  $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tato koncentrace byla zvolena na základě měření koncentrační řady CTAB. Při této koncentraci je možné pozorovat pouhým okem barevné rozdíly vzorků a naměřená absorbance dosahuje ideálních hodnot. Vzorky byly připraveny třikrát ručně různou dobu (deset protřepání zkuševkou a intenzivní třepání zkuševkou 30 s a 60 s), nebo byly zkuševky se vzorky vloženy na 2 minuty do ultrazvuku.



Obr. 20: Vliv délky a způsobu třepání vzorků (A=deset protřepání; B=30 sekund třepání; C=60 sekund třepání; D=2 min ultrazvuk)

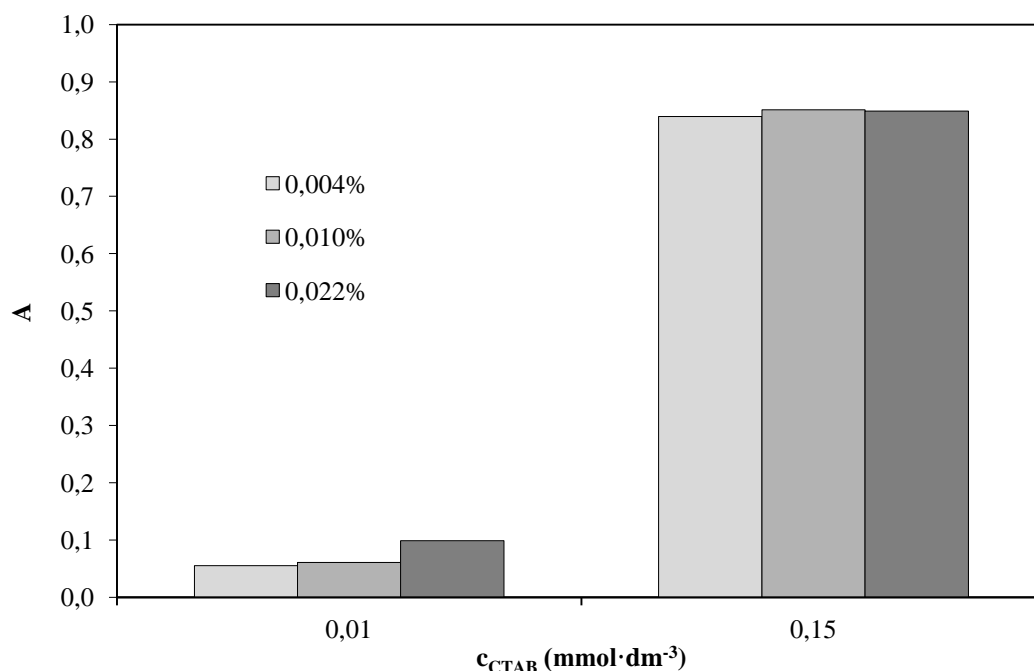
Z naměřených hodnot (obr. 20) vyplývá, že délka a způsob třepání mají na výsledné hodnoty absorbance nemalý vliv. Z výsledků je patrné, že vzorek je důležité třepat a ne jej homogenizovat ultrazvukem. Při přípravě vzorku ultrazvukem dojde k vytvoření emulze, kde dochází k obtížné separaci fází. Chloroformová fáze tak nebyla čirá a musela být dvakrát filtrována. Opakování filtrace mohlo mít vliv na výsledné hodnoty. Dále není dostačující zkumavku jen párkrát protřepat. V takovém případě nedojde k převedení veškerého CTAB do chloroformu a naměřené hodnoty se o dost liší. Je tedy nutné provést intenzivní třepání po co nejdelší dobu. Výsledné absorbance pro délku třepání 30 s a 60 s jsou již téměř shodné. Pro další experimenty bylo tedy vždy použito intenzivní třepání a to po dobu 60 s.

### 5.2.2 Vliv koncentrace kyseliny pikrové

Pro studium vlivu koncentrace kyseliny pikrové na výsledné hodnoty absorbance byly použity 3 různé koncentrace kyseliny pikrové (0,004%, 0,01% a 0,022%) a 2 různé koncentrace tenzidu CTAB ( $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

Tab. 1: Průměrné hodnoty absorbancí a std. odchylky

	$c_{\text{CTAB}} (\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3})$			
	0,01		0,15	
$c_{\text{kys.pikrová}} (\%)$	A průměr	smodch	A průměr	smodch
<b>0,004</b>	0,056	0,001	0,839	0,042
<b>0,010</b>	0,061	0,006	0,851	0,023
<b>0,022</b>	0,099	0,003	0,849	0,015



Obr. 21 Vliv koncentrace kyseliny pikrové (kyselina pikrová o koncentraci 0,004 %, 0,01% a 0,022 %)

Z naměřených hodnot (tab. 1, obr. 21) vyplývá, že přesná koncentrace kyseliny pikrové více ovlivňuje výsledné hodnoty absorbance u méně koncentrovaných vzorků než u vzorků s větší koncentrací CTAB. Ale ani pro jednu koncentraci CTAB nejsou rozdíly mezi absorbancemi pro jednotlivé koncentrace kyseliny pikrové moc rozdílné. Pro koncentraci CTAB  $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  jsou hodnoty absorbancí dokonce téměř shodné.

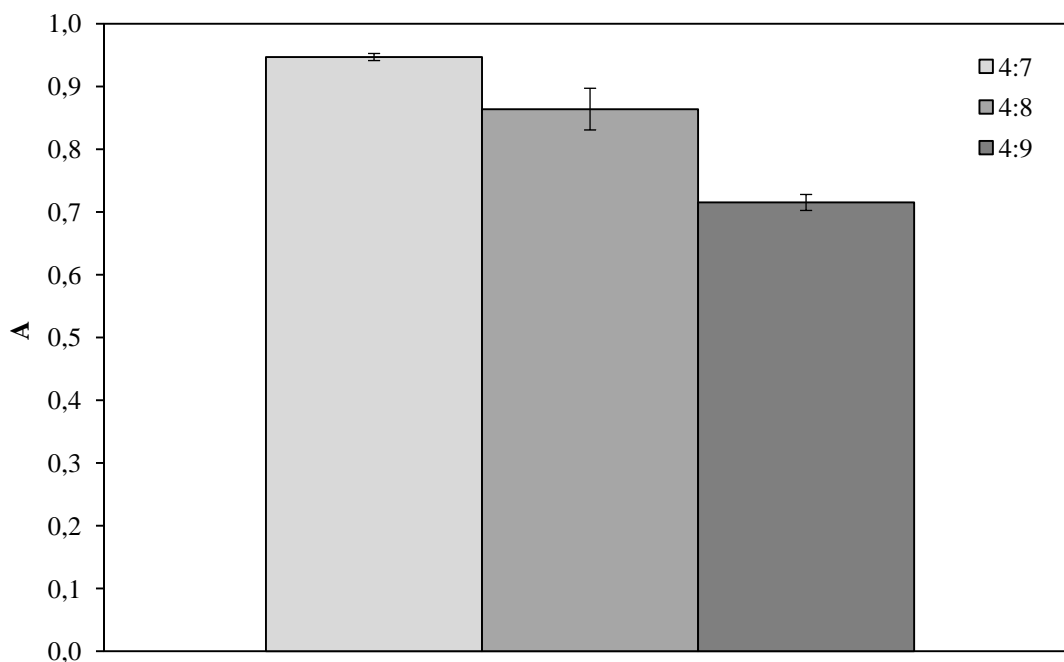
Pro další experimenty byly zásobní roztoky kyseliny pikrové nadále připravovány stejným způsobem o přibližné koncentraci 0,01%.

### 5.2.3 Vliv přesného objemu kyseliny pikrové

Pro prověření vlivu přesného objemu kyseliny pikrové na výsledné hodnoty absorbance byl použit tensid CTAB o koncentraci  $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pro experiment byly jako vhodné objemy vzorku a kyseliny pikrové zvoleny poměry 4:7, 4:8 a 4:9 (vzorek CTAB:kys.pikrová v chloroformu).

Ze sloupcového grafu (obr. 22) je jasné viditelné, že množství kyseliny pikrové má značný vliv na výsledné hodnoty absorbancí. Se vzrůstajícím objemem kyseliny pikrové pozorujeme lineární pokles naměřených absorbancí. V menším objemu kyseliny je totiž koncentrace CTAB větší a tím roste i absorbance.

U dalších měření tedy bylo velmi dbáno na přesné převádění vzorků do zkumavek a přidavek kyseliny pikrové v chloroformu, aby byl objem co nejvíce přesný, měření tak bylo zatíženo co nejmenší chybou a výsledky byly reprodukovatelné.



Obr. 22: Vliv přesného objemu kyseliny pikrové

#### 5.2.4 Optimalizovaný postup

Z naměřených výsledků pro ověření metodiky vyplývá, že koncentrace kyseliny pikrové v chloroformu nemá na intenzitu zbarvení vzorku velký vliv. I přesto by měla být používána koncentrace tohoto roztoku 0,01%. Doba třepání pro extrakci tenzidu do chloroformu byla stanovena na optimální čas 60 sekund intenzivního třepání zkumavky. Nejvíce konečné hodnoty absorbancí ovlivní přesný přírůstek roztoku kyseliny pikrové. Při přípravě vzorků musí být dodržen poměr CTAB k roztoku kyseliny pikrové v chloroformu 1:2.

### 5.3 Vliv přítomnosti hyaluronanu

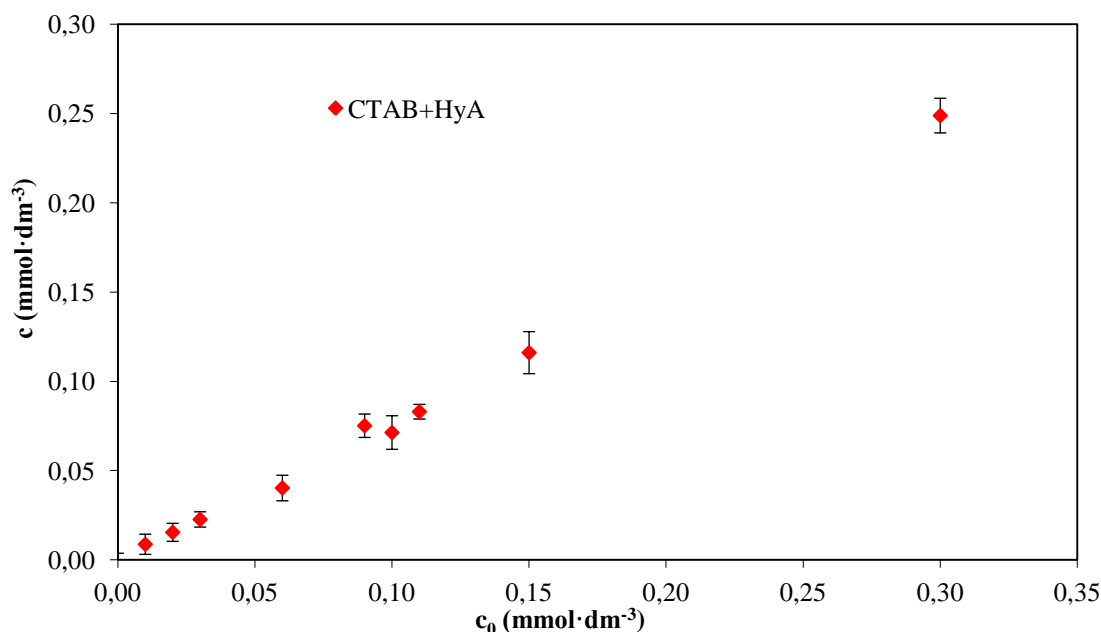
Při tomto měření šlo především o to zjistit jaký vliv na výsledné koncentrace CTAB ve vzorku má přítomnost hyaluronanu ve vodném prostředí a v prostředí fyziologické iontové síly ( $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl). Pro experimenty byla zvolena jedna molekulová hmotnost hyaluronanu (458 kDa) o koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  ve vzorku. Dle vypracované bakalářské práce [50] by mohla být očekávána nějaká vychýlení v průběhu stanovených hodnot CTAB, a to především v rozmezí koncentrací CTAB od  $0,02 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  až do  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Při těchto koncentracích by mělo docházet k tvorbě premicelárních agregátů (tzv. minimicel) [50].

Ve vodném prostředí nejsou z naměřených hodnot (obr. 23) patrné velké rozdíly u předpokládané oblasti existence minimicel. Znatelný zlom je na průběhu naměřených hodnot zaznamenán až při koncentraci CTAB  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . V tomto bodě došlo k separaci fází. Část CTAB byla uzavřena do gelové fáze a stanovené množství CTAB tak bylo sníženo.

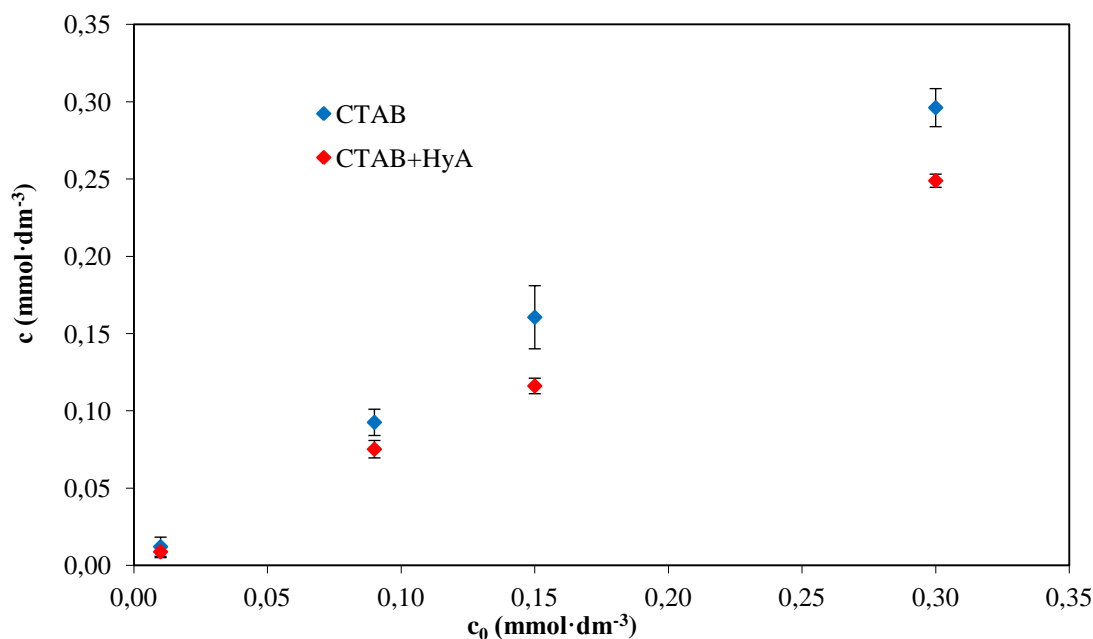
Pro stanovení interakcí HyA-tenzid a také pro zjištění afinity CTAB ke kyselině pikrové nebo CTAB k HyA bylo provedeno srovnání naměřených hodnot systému CTAB+HyA s čistým CTAB (obr. 24). Z obrázku je patrné, že již při nízkých koncentracích CTAB, menších, než při kterých dochází k separaci fází, jsou stanovené hodnoty systému CTAB+HyA nižší než hodnoty čistého CTAB. Tento výsledek potvrzuje informaci z bakalářské práce [50], že hyaluronan s tenzidem interaguje. Zároveň je dokázáno, že CTAB



vykazuje větší afinitu k hyaluronanu než ke kyselině pikrové. Kdyby tomu bylo naopak, byly by pro nízké koncentrace CTAB stanoveny stejné hodnoty jako pro čisté CTAB. Při koncentraci CTAB  $0,09 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  je rozdíl mezi hodnotami čistého CTAB a CTAB+HyA větší než pro koncentraci  $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a naopak menší pro zbylé dvě vyšší koncentrace. Koncentrace HyA ale zůstala stejná a počet vazných míst se nezměnil. V systému tedy mohlo dojít k separaci fází při nižší koncentraci tenzidu, která ale nebyla pouhým okem pozorovatelná, nebo dochází s rostoucí koncentrací tenzidu k tvorbě různě velkých premicelárních útvarů. Z grafu je patrné, že při vyšších koncentracích CTAB, po separaci gelové fáze, se rozdíl mezi hodnotami čistého CTAB a CTAB+HyA již neměnil. Do vytvořené gelové fáze se tedy uzavře jen určité množství tenzidu.



Obr. 23: Vliv přídavku HyA na koncentraci CTAB v prostředí  $\text{H}_2\text{O}$



Obr. 24: Srovnání vybraných koncentrací CTAB a CTAB+HyA v  $\text{H}_2\text{O}$

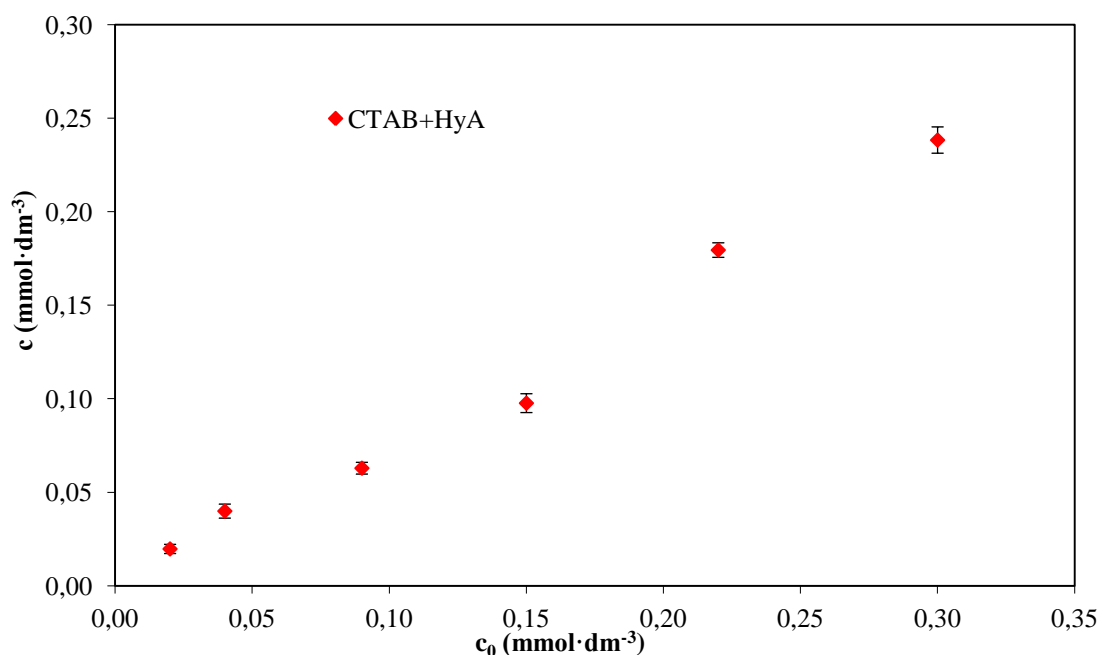
Přesné hodnoty rozdílů mezi koncentracemi čistého CTAB a CTAB+HyA a molární poměr molu tenzidu na mol vazných míst HyA udává tabulka (tab. 2). Kde  $n_0$  odpovídá počátečnímu počtu molů CTAB ve všech vzorcích,  $n_1$  stanovenému počtu molů čistého CTAB,  $n_2$  stanovenému počtu molů CTAB+HyA a  $n_{vm}$  počtu molů vazných míst. Člen  $n_1 - n_2$  vyjadřuje množství CTAB navázaného na hyaluronan. HyA je složen z opakující se disacharidové jednotky, kde molární hmotnost jedné disacharidové jednotky činí přibližně  $400 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Na každou takovou jednotku připadá jedna skupina  $\text{COO}^-$ . Předpokladem pro výpočet vazných míst je stoprocentní disociace všech skupin. Pro HyA s koncentrací  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  je pak počet vazných míst  $0,025 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Z procentuálních hodnot je jasné vidět, že při koncentracích, kdy dochází k separaci fází, je množství tenzidu navázaného na HyA mnohem větší, než je počet vazných míst.

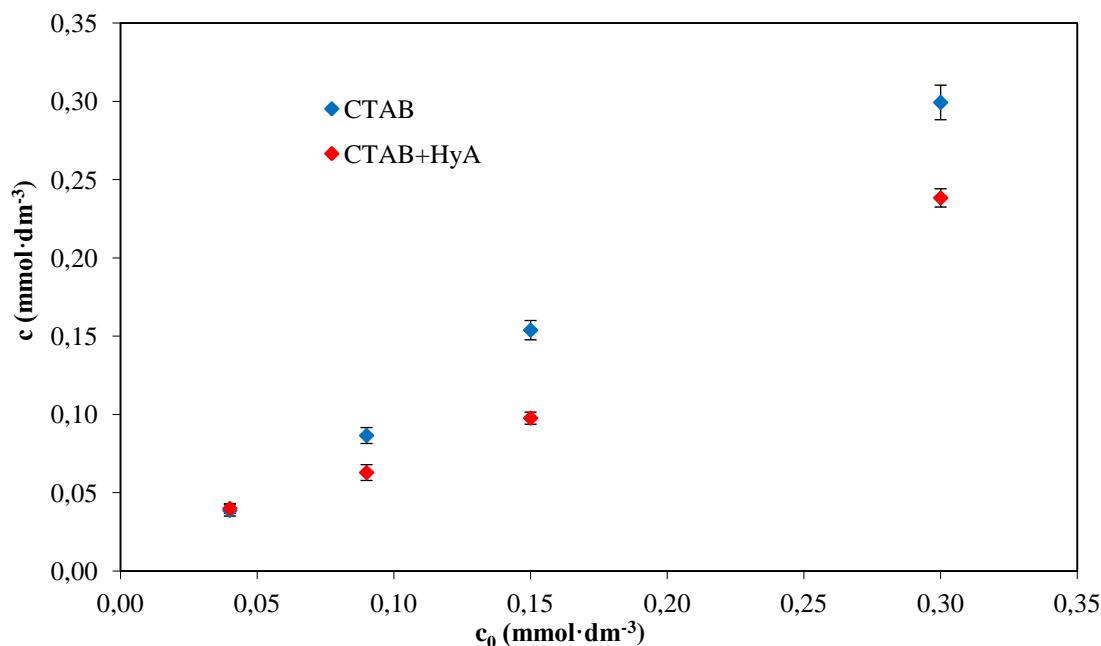
Tab. 2: Látková množství CTAB pro jednotlivá stanovení ve vodném prostředí

$n_0$ (mmol)	$n_1$ (mmol)	$n_2$ (mmol)	$n_1 - n_2$ (mmol)	$(n_1 - n_2)/n_{vm}$	$(n_1 - n_2)/n_{vm}$ (%)
0,01	0,012	0,009	0,003	0,132	13,25
0,09	0,092	0,075	0,017	0,695	69,50
0,15	0,160	0,116	0,044	1,778	177,8
0,30	0,296	0,249	0,047	1,891	189,1

Vliv přítomnosti hyaluronanu na výsledné koncentrace CTAB ve vzorku byl stanoven i v prostředí  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl. V grafu (obr. 25) je vidět, že přidavek hyaluronanu ovlivní množství CTAB ve vzorku. Na průběhu naměřených hodnot, který by měl být spíše lineární, je od koncentrace  $0,09 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pozorován ztuhlý zlom. V systému tedy dochází k interakcím CTAB a HyA. Tato změna může být dána i vytvořením micel. V prostředí NaCl dochází k agregaci CTAB již při nižších koncentracích tenzidu a CMC látky v tomto prostředí je stanovena na  $c_{CTAB} = 0,06 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  [51]. V prostředí fyziologické iontové síly nenastává separace fází, takže snížení stanovených hodnot je dáno čistě interakcemi mezi CTAB a HyA.



Obr. 25: Vliv přidavku HyA na koncentraci CTAB v prostředí NaCl



Obr. 26: Srovnání vybraných koncentrací CTAB a CTAB+HyA v NaCl

Při srovnání naměřených hodnot systému CTAB+HyA s čistým CTAB (obr. 26) v prostředí NaCl je jasné vidět, že hodnoty stanovených koncentrací za kritickou micelární koncentrací CTAB v  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl nejsou vyrovnané. Zaznamenáváme významný pokles oproti čistému CTAB. S rostoucí koncentrací tenzidu dochází ke zvětšování rozdílu mezi stanovenými koncentracemi čistého CTAB a CTAB+HyA. Tímto výsledkem je prokázáno, že i v tomto prostředí spolu CTAB s hyaluronanem interaguje a tenzid vykazuje větší afinitu k HyA než ke kyselině pikrové.

Přesné hodnoty stanovených počtu molů a poměru molu tenzidu na mol vazných míst HyA jsou opět uvedeny v tabulce (tab. 3). Z procentuálních hodnot je dokázáno, že se zvyšující se koncentrací CTAB ve vzorku, roste množství tenzidu navázaného na hyaluronan.

Tab. 3: Látková množství CTAB pro jednotlivá stanovení v prostředí NaCl

$n_0$ (mmol)	$n_1$ (mmol)	$n_2$ (mmol)	$n_1 - n_2$ (mmol)	$(n_1 - n_2)/n_{vm}$	$(n_1 - n_2)/n_{vm}$ (%)
0,04	0,040	0,039	0,001	0,042	4,172
0,09	0,087	0,063	0,024	0,788	78,81
0,15	0,154	0,098	0,056	1,873	187,3
0,30	0,299	0,238	0,061	2,033	203,3

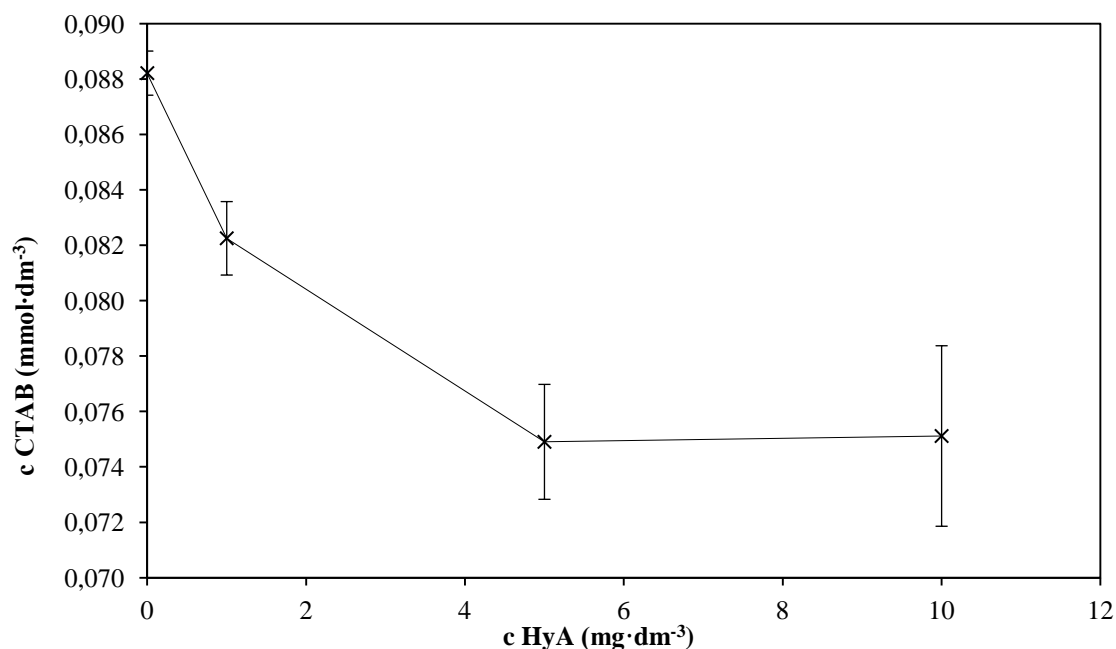
#### 5.4 Interakce CTAB s hyaluronanem o různých koncentracích

V tomto měření bylo zkoumáno jaký vliv na výsledné koncentrace CTAB ve vzorku má rozdílná koncentrace hyaluronanu. Vzorky byly připraveny ve vodném prostředí i v prostředí fyziologické iontové síly ( $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl). Pro experimenty byla zvolena jedna molekulová hmotnost hyaluronanu (458 kDa) o velmi nízkých koncentracích (1, 5 a  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Jako vhodně srovnatelné koncentrace CTAB byly vybrány  $c_{CTAB} = 0,09 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $c_{CTAB} = 0,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

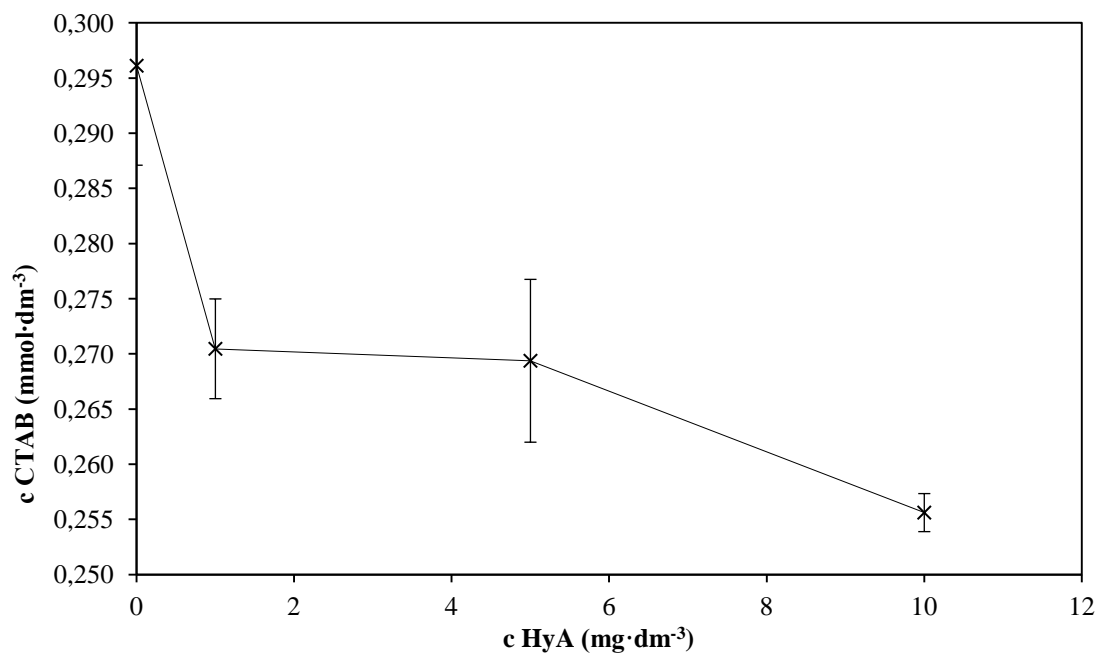
Z grafů je patrné (obr. 27, obr. 28), že pro stanovené hodnoty koncentrací ve vodném prostředí platí, že čistý roztok CTAB má nejvyšší koncentraci a se zvyšujícím se přidavkem hyaluronanu hodnoty klesají. S rostoucí koncentrací HyA se zvětšuje počet vazných míst, kde mohou být jednotlivé molekuly nebo vytvořené minimicely CTAB navázány, čímž klesá koncentrace CTAB v roztoku. I přesto, že použité koncentrace tenzidu jsou mnohonásobně vyšší než počet vazných míst jednotlivých koncentrací HyA, je zaznamenán významný pokles hodnot.

Z grafu (obr. 27) je vidět, že pro koncentraci CTAB  $0,09 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  s HyA  $1$  a  $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  nastal pokles stanovených koncentrací. Pro HyA  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  pak zaznamenáváme stejné hodnoty jako pro HyA  $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , i když se počet vazných míst zvýšil. U vzorku s koncentrací HyA  $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl ale na vialkách pozorován velice slabý, téměř neznatelný gelový kroužek. Došlo k separaci fází. To mohlo způsobit uzavření většího množství CTAB do tenké gelové vrstvy a snížení koncentrace tenzidu ve zbylém roztoku.

Z grafu pro koncentraci CTAB  $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (obr. 28) je jasně vidět prudký pokles hodnot pro koncentraci HyA  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Následující koncentrace HyA má stanoveny téměř shodné hodnoty. U těchto roztoků ale nebyla pozorována jasná separace fází. Na vialkách obou vzorků bylo vytvořeno jen pár gelových bodů. Tento výsledek může být dán tím, že v systému se s velkou pravděpodobností vyskytují premicelární útvary s rozdílným charakterem. Na řetězec HyA se tedy mohou navázat minimicely, které mají různou velikost. Nízká hodnota stanovené koncentrace CTAB pro HyA  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  je z části dána počtem vazných míst, ale také byl na vialce pozorován viditelný gelový kroužek, kde byl tenzid zadržen.

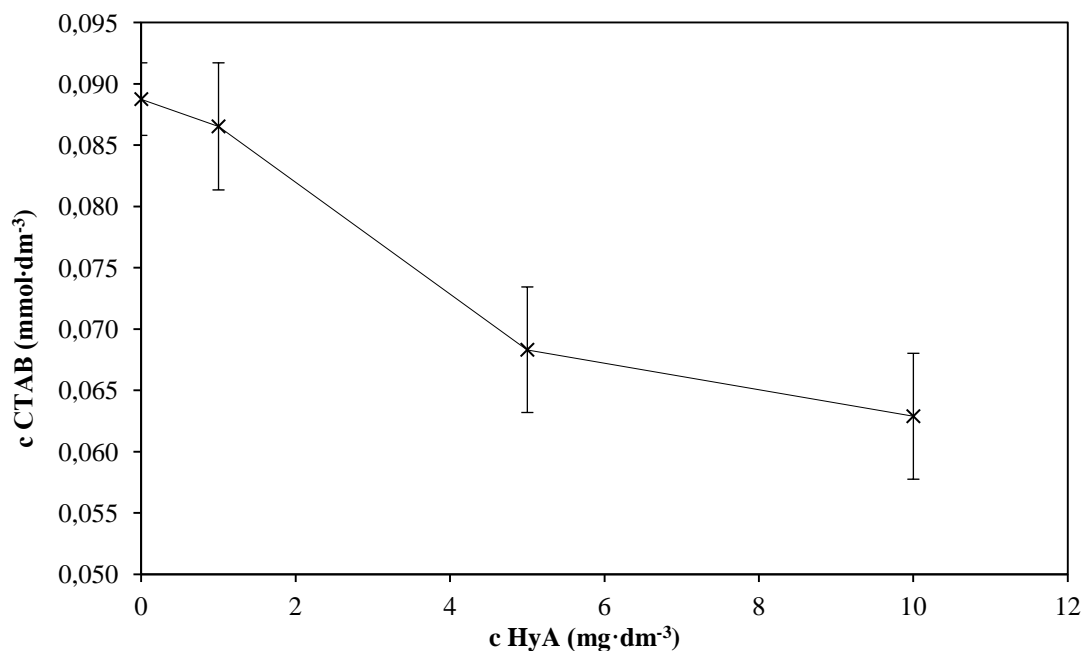


Obr. 27: Vliv přidavku hyaluronanu na koncentrace CTAB ( $c_0=0,09 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v  $\text{H}_2\text{O}$

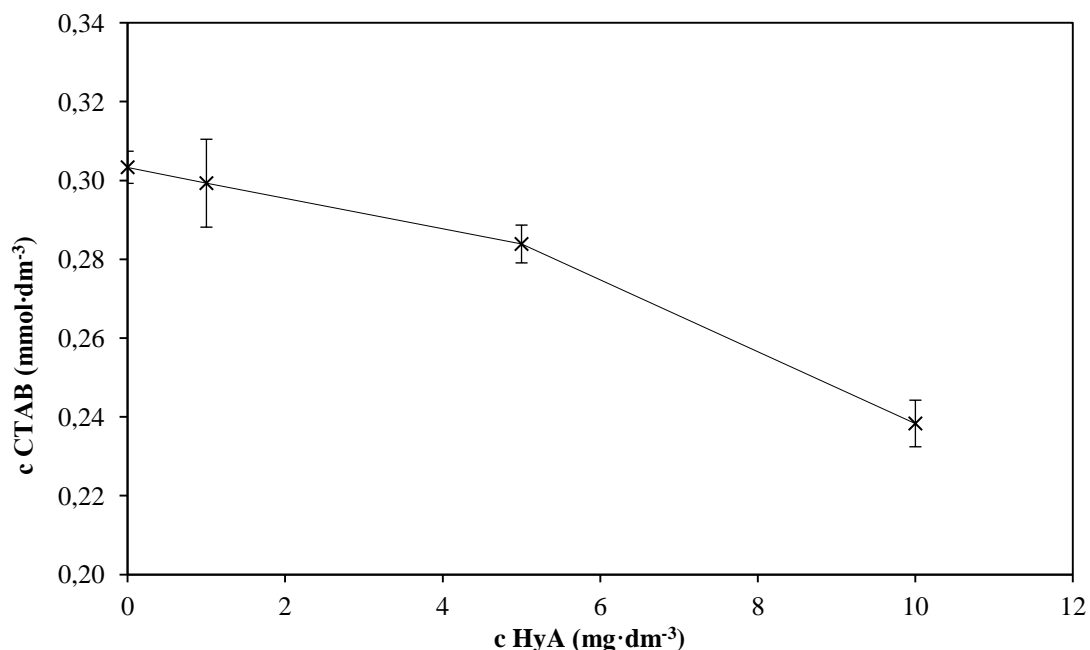


Obr. 28: Vliv přidavku hyaluronanu na koncentrace CTAB ( $c_0=0,3 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) v  $\text{H}_2\text{O}$

Výsledný průběh naměřených hodnot systému CTAB+HyA v prostředí  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl (obr. 29, obr. 30) přesně vypovídá o interakcích mezi CTAB a HyA. V prostředí NaCl totiž nedochází k tvorbě gelové vrstvy a uvedené hodnoty jsou tedy výsledkem stanovení množství CTAB ve vzorcích.



Obr. 29: Vliv přidavku hyaluronanu na výsledné koncentrace CTAB ( $c_0=0,09 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) v prostředí  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl



Obr. 30: Vliv přidavku hyaluronanu na výsledné koncentrace CTAB ( $c_0=0,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v prostředí  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl

V grafech (obr. 29, obr. 30) je pro obě vybrané koncentrace CTAB zaznamenán postupný pokles naměřených hodnot vzorků. Mírný rozdíl u velikosti poklesu můžeme pozorovat u vzorku s koncentrací HyA  $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tento výsledek může být opět dán tím, že v systému se s velkou pravděpodobností vyskytují zagregované útvary s rozdílným charakterem. Na řetězec HyA se mohou navázat minimicely nebo právě micely s různou velikostí a v roztoku pak zbude méně volných molekul CTAB, které vytvoří komplex s kyselinou pikrovou.

## 5.5 Dialýza

Metodou dialýzy bylo provedeno studium interakcí mezi hyaluronanem (458 kDa) o koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  a tenzidem. Největší pozornost byla zaměřena na stabilitu těchto systémů ve srovnání s čistými roztoky CTAB a také na rozdíly vlastností systémů ve vodném a fyziologickém roztoku. Byly připraveny celkem čtyři základní typy vzorků. Jednalo se o CTAB a CTAB+HyA ve vodném prostředí a CTAB a CTAB+HyA v prostředí NaCl. Výsledné koncentrace byly vypočteny z jednotlivých kalibračních křivek odpovídajících systémů. Pro provedení metody byly vybrány celkem 3 hlavní doby trvání dialýzy a to 24 hodin, 48 hodin a 120 hodin. Počáteční koncentrace byly určeny dle požadavků na daný experiment a také podle vypracované bakalářské práce [50]. Nejprve byly provedeny experimenty ve vodném prostředí, poté i v prostředí NaCl.

V grafech jsou pro vizualizaci rychlosti dialýzy uvedeny zjištěné koncentrace odebraných vzorků z vnitřní části dialyzační membrány (retentát) a příslušného vnějšího roztoku v kádince (permeát). V tabulkách jsou pro interpretaci stability systému CTAB+HyA zaznamenány hodnoty poměrů koncentrací retentátu a permeátu.

## 5.5.1 Vodné prostředí

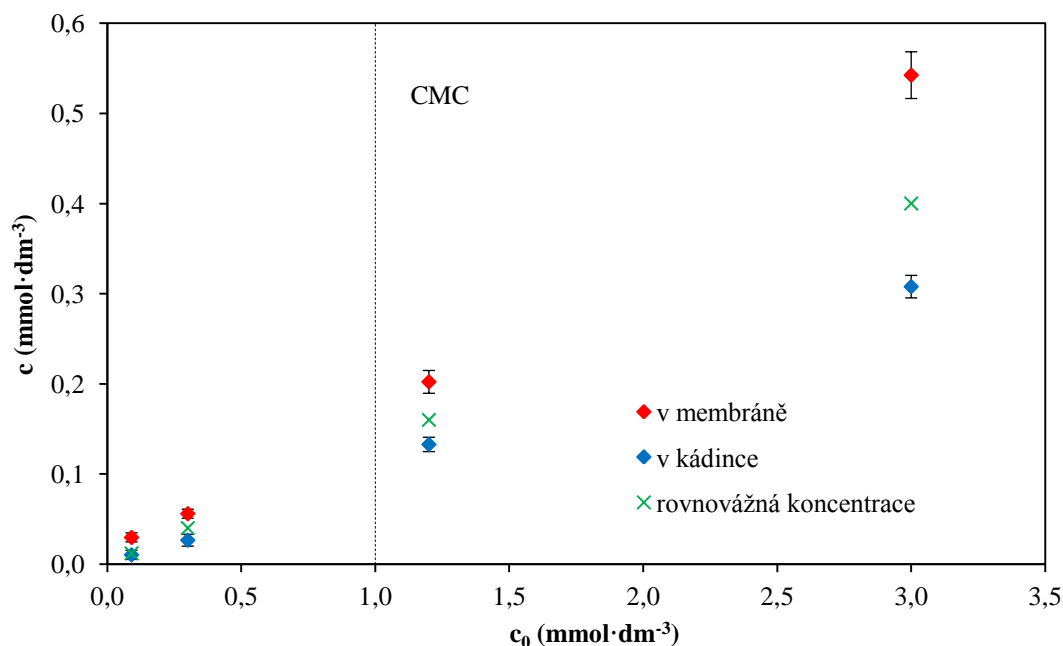
### 5.5.1.1 CTAB

Pro dialýzu samotného tenzidu byly vybrány koncentrace CTAB před a za kritickou micelární koncentrací. A to pro možnost porovnání, zda přítomnost micel má vliv na rychlost prostupu CTAB přes membránu, či nikoli.

Z grafu (obr. 31) je patrné, že po 24 hodinách dialýzy v systému nedošlo k vyrovnání koncentrací. Před experimentem existoval předpoklad, že roztoky s koncentrací vyšší než CMC budou difundovat přes membránu pomaleji než roztoky bez micel. Dle výsledných poměrů stanovených z naměřených koncentrací retentátu (koncentrace CTAB v membráně) ( $c_r$ ) ku permeátu (koncentrace CTAB v kádince) ( $c_p$ ) (tab. 4) se ukázalo, že je dosaženo přesně opačných hodnot a to pro všechny časy prováděných dialýz. Roztoky s nižší koncentrací CTAB než je hodnota CMC mají tedy vyšší výsledný poměr  $c_r/c_p$ , což znamená, že látka z vnitřního prostoru membrány přecházela do rozpouštědla pomaleji. Velikost pórů použitých membrán je 3,5 kDa. Za předpokladu, že v polárním prostředí je minimální agregační číslo tenzidu alespoň 50, může být vyloučen fakt, že došlo k průniku micely přes membránu a tím k rychlému navýšení koncentrace na opačné straně membrány.

Další možností je, že v systému došlo k rozpadu micel a tím k rychlejší dialýze. Za přítomnosti membrány je kromě fázového rozhraní roztok-vzduch přítomno i rozhraní roztok-membrána/rozpouštědlo. Plocha těchto fázových rozhraní nemusela být daným počtem molekul CTAB nasycena a micely nebyly přítomny. Rychlejší přestup CTAB do vody byl dán vlivem rozdílu koncentrací.

V grafu jsou pro jednotlivé vzorky naznačeny výsledné koncentrace CTAB po ideálním promísení vloženého roztoku tenzidu do membrány s vodným prostředím v kádince (rovnovážná koncentrace). Je vidět, že po dialýze 24 hodin se stanovené hodnoty pro retentát a permeát k těmto koncentracím blíží.



Obr. 31: Dialýza CTAB v  $H_2O$  24 hodin

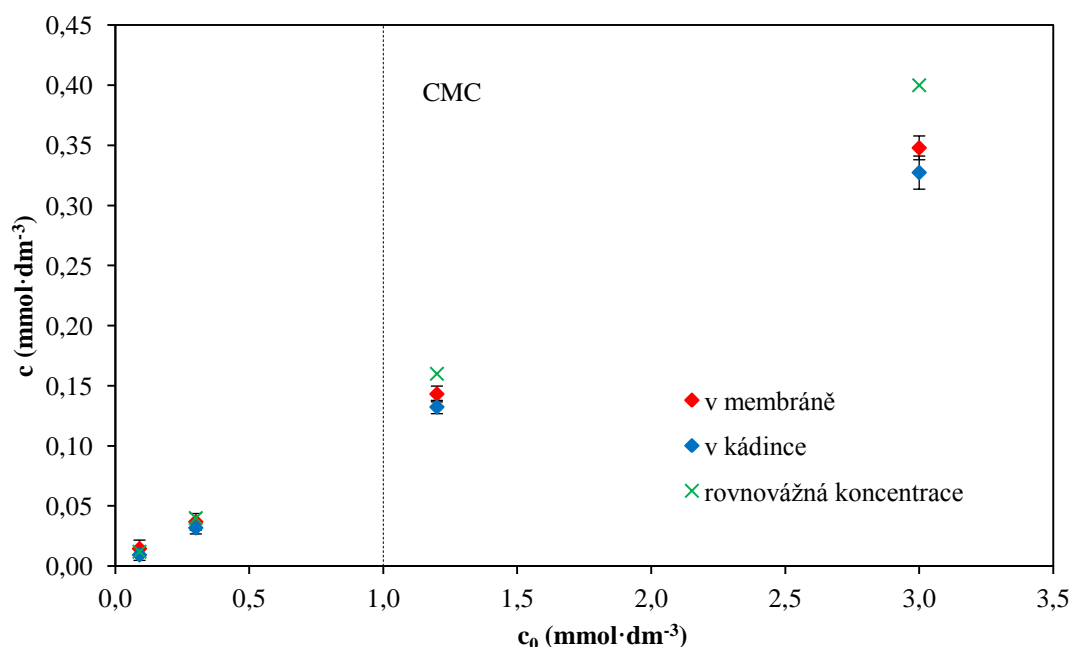
Tab. 4: Poměry koncentrací  $c_r/c_p$  CTAB v  $H_2O$  v daných dobách

$c_0$ CTAB ( $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	$c_r/c_p$					
	doba dialýzy					
	24 hod		48 hod		120 hod	
	průměr	smodch	průměr	smodch	průměr	smodch
0,09	2,93	0,51	1,55	0,25	1,10	0,05
0,3	2,12	0,23	1,16	0,05	1,05	0,05
1,2	1,52	0,02	1,08	0,04	0,99	0,03
3	1,76	0,12	1,06	0,05	1,03	0,01

Obrázek (obr. 32) zobrazuje stav dialýzy CTAB ve vodě po 48 hodinách. Výsledné koncentrace tenzidu v retentátu a permeátu jsou již téměř vyrovnané. Potvrzením jsou i hodnoty poměru  $c_r/c_p$  v tabulce (tab. 4), které se pomalu blíží hodnotě 1, kromě vzorku s původní nejnižší koncentrací CTAB.

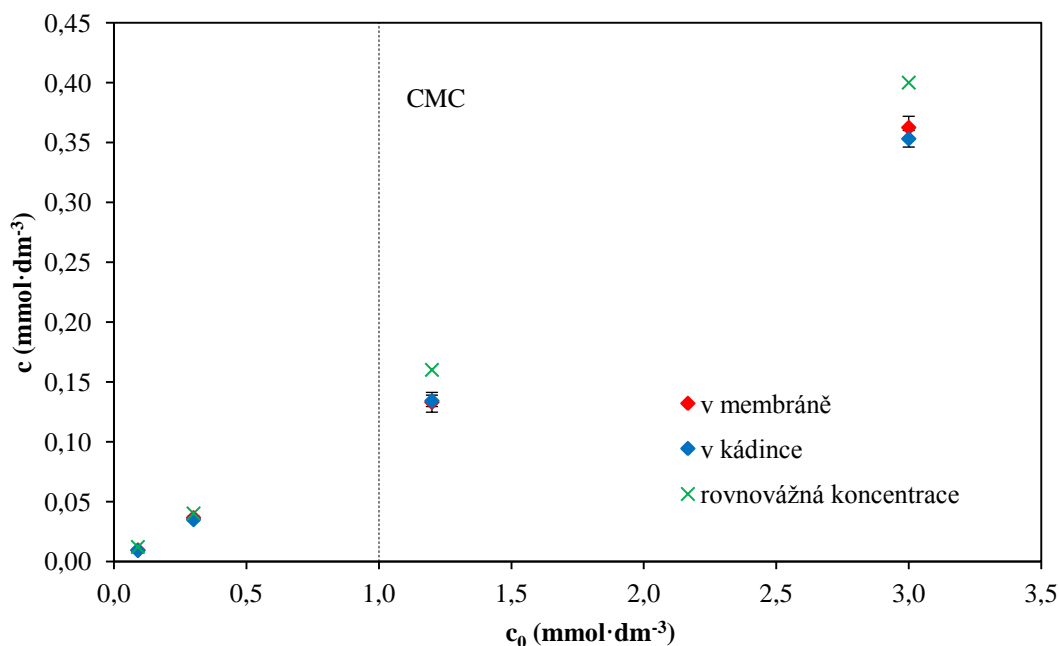
Po 120 hodinách dialýzy (obr. 33) byla v systému dosažena stoprocentní rovnovážná koncentrace mezi původním roztokem v membráně a vnějším rozpouštědlem. Vizualní výsledky z grafu potvrzují i hodnoty poměrů koncentrací v tabulce (tab. 4). Vyrovnáním koncentrací retentátu a permeátu bylo prokázáno to, že membrána na výsledné koncentrace nemá vliv. I v její přítomnosti dojde u roztoku čistého CTAB k vyrovnání koncentrací roztoků uvnitř i vně membrány.

To, že jsou stanovené koncentrace pro dialýzu 48 hodin i 120 hodin menší než vypočtené rovnovážné koncentrace může být dáno zadržením určitého množství tenzidu na povrchu membrány či kádinky nebo uvnitř pórů membrány, případně chybou přípravy vzorků.



Obr. 32: Dialýza CTAB v  $H_2O$  48 hodin





Obr. 33: Dialýza CTAB v H<sub>2</sub>O 120 hodin

#### 5.5.1.2 CTAB+HyA

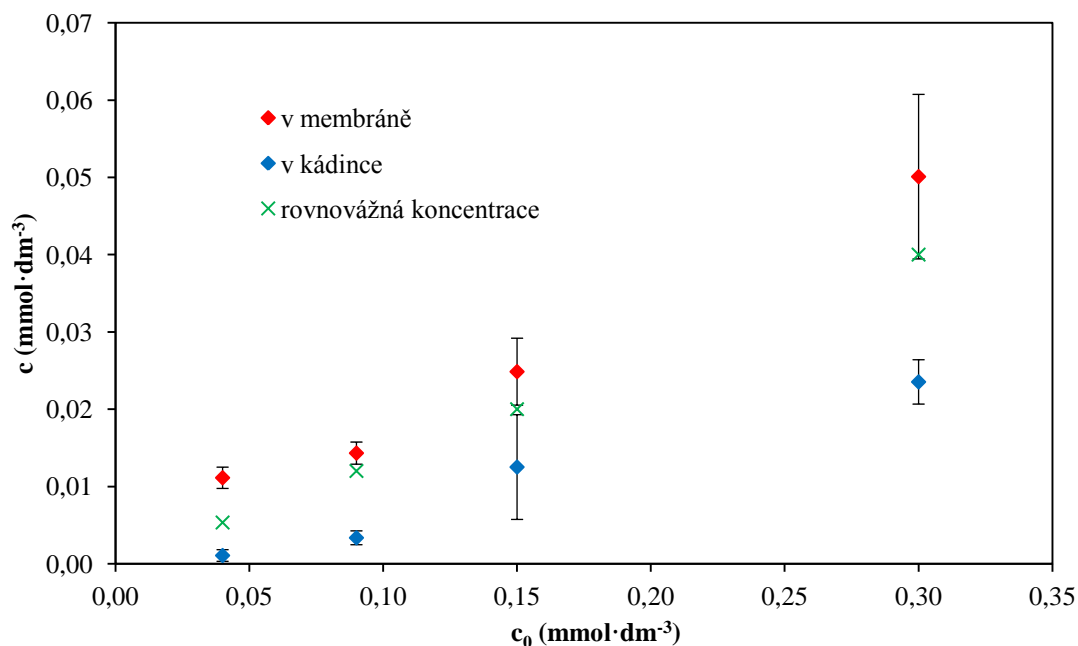
Pro experimenty se systémem CTAB+HyA ve vodním prostředí byly pro přípravu vzorků vybrány nízké koncentrace CTAB, především za kritickou agregační koncentrací (CAC) stanovené v bakalářské práci [50]. Důvodem byl průzkum stability interakcí mezi CTAB a hyaluronanem.

Základním předpokladem experimentu bylo, že v systému CTAB+HyA se vyskytují tzv. minimicely jako kondenzované systémy na řetězcích hyaluronanu, které mají větší molekulární hmotnost než je MWCO membrány a neprojdou tak přes póry použité membrány. Dalším bodem bylo, že v ideálním případě, by mezi hyaluronanem a CTAB měly být natolik silné interakce, které úplně zamezí nebo alespoň zpomalí přestup CTAB přes dialyzační membránu a v membráně tak zůstane i po delší době větší počet molekul CTAB než mimo ni.

Graf (obr. 34) zobrazuje výsledné hodnoty koncentrací systému CTAB+HyA ve vodě po 24 hodinách dialýzy. V systému za tuto dobu došlo k přestupu malého množství CTAB přes membránu. Výsledná rovnovážná koncentrace se nachází mezi stanovenými hodnotami CTAB po dialýze.

Poměry koncentrací (tab. 5) ukazují, že k rychlejšímu přestupu CTAB dochází při vyšších koncentracích CTAB. To může být způsobeno tím, že při přípravě vzorků pro dialýzu došlo k mírné separaci fází. Na stěnách vialky se zadrželo určité množství hyaluronanu a do membrány tak bylo přeneseno samotné CTAB. Což by mohlo znamenat, že samotné CTAB přechází přes membránu rychleji než za přítomnosti hyaluronanu. Zároveň je v těchto roztocích větší rozdíl koncentrací mezi vzorkem v membráně a rozpouštědlem v kádince a látka tak přes membránu mohla difundovat rychleji.

Při srovnání výsledných poměrů  $c_r/c_p$  čistého CTAB a systému CTAB+HyA ( $c_{\text{HyA}}=10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) po 24 hodinách dialýzy pro počáteční koncentrace CTAB  $0,09 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  bylo zjištěno, že u systému s hyaluronanem dochází k pomalejšímu přestupu zkoumané látky než u roztoku čistého CTAB.



Obr. 34: Dialýza CTAB+HyA v H<sub>2</sub>O 24 hod

Tab. 5: Poměry koncentrací  $c_r/c_p$  CTAB+HyA v H<sub>2</sub>O v daných dobách

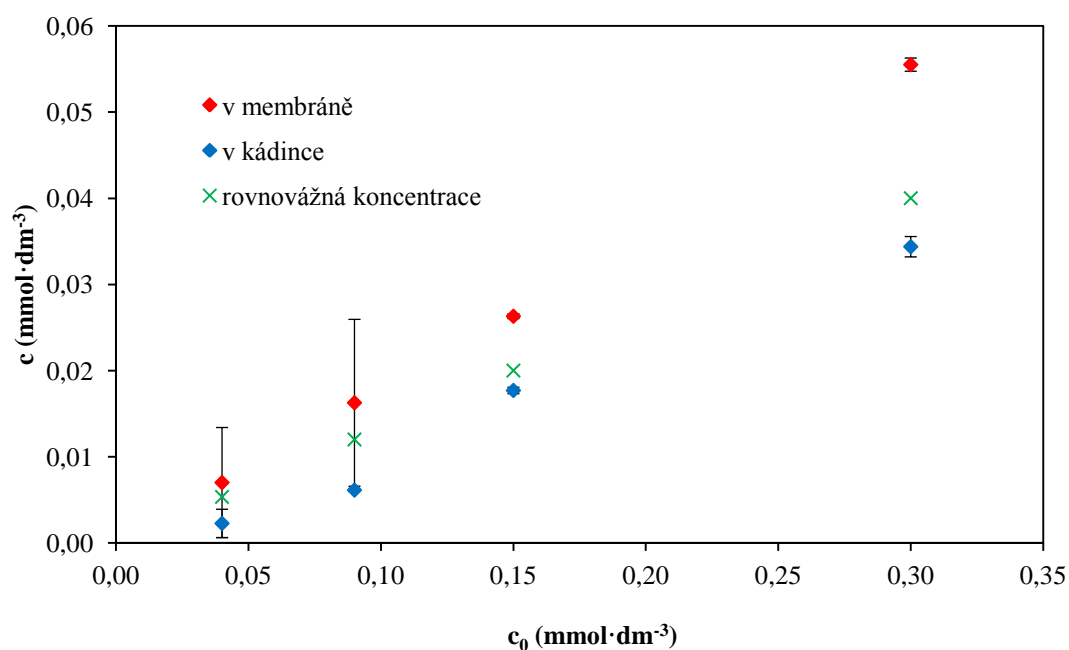
$c_0$ CTAB (mmol·dm <sup>-3</sup> )	$c_r/c_p$					
	doba dialýzy					
	24 hod		48 hod		120 hod	
	průměr	smodch	průměr	smodch	průměr	smodch
0,04	7,11	0,36	3,60	0,17	1,30	0,27
0,09	3,62	0,84	1,28	0,10	1,23	0,19
0,15	1,67	0,19	1,49	0,03	1,06	0,04
0,3	2,13	0,38	1,37	0,31	1,03	0,06

Z grafu pro dialýzu CTAB+HyA 48 hodin (obr. 35) je vidět, že koncentrace CTAB uvnitř membrány a vně ještě nejsou v rovnováze, ale začínají se přibližovat k hodnotám rovnovážných koncentrací. Hodnoty poměrů stanovených koncentrací retentátu a permeátu  $c_r/c_p$  (tab. 5) se ještě neblíží hodnotě 1.

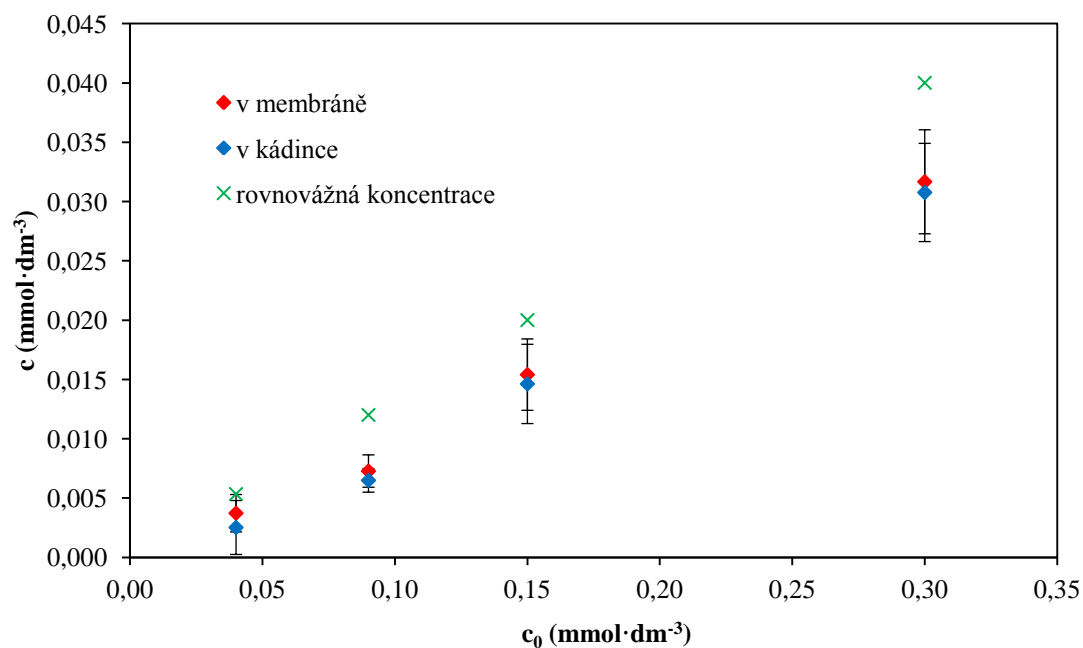
Po dialýze 120 hodin byly koncentrace retentátu a permeátu na první pohled téměř vyrovnány (obr. 36). Konečné koncentrace dosahují mnohem nižších hodnot, než jsou hodnoty koncentrací po ideálním promísení počátečních roztoků (rovnovážná koncentrace). To může být opět dáno částečným zadržením tenzidu na membráně či kádince, ale především přítomností hyaluronanu a jeho interakcemi s CTAB. Tím, že HyA s tenzidem interaguje (viz kapitola 5.3), je v roztoku celkově méně molekul volného CTAB, které mohou přecházet přes membránu, a pak jsou i konečné koncentrace CTAB po dialýze nižší. To dokazuje interakce a jejich stabilitu v systému CTAB+HyA ve vodném prostředí.

Poměry  $c_r/c_p$  (tab. 5) pro roztoky s vyšší koncentrací CTAB, u kterých proběhla fázová separace, jsou téměř rovny 1. U těchto vzorků jsou výsledné hodnoty v porovnání s

rovnovážnou koncentrací nižší, protože část CTAB ani nebyla přenesena do dialyzačního systému, neboť zůstala uzavřena v gelové vrstvě na vialce. Naopak z poměrů  $c_r/c_p$  je vidět, že u vzorků s nižší koncentrací CTAB, kde neproběhla fázová separace, se výsledný poměr ještě zcela neblíží hodnotě 1. To by mohlo být dalším důkazem, že systém CTAB+HyA v oblasti existence premicelárních útvarů je natolik stabilní, že ani po delší době nedojde k vyrovnání koncentrací retentátu a permeátu. Ale s ohledem na chybu tohoto stanovení je toto tvrzení málo pravděpodobné.



Obr. 35: Dialýza CTAB+HyA v H<sub>2</sub>O 48 hod



Obr. 36: Dialýza CTAB+HyA v H<sub>2</sub>O 120 hod

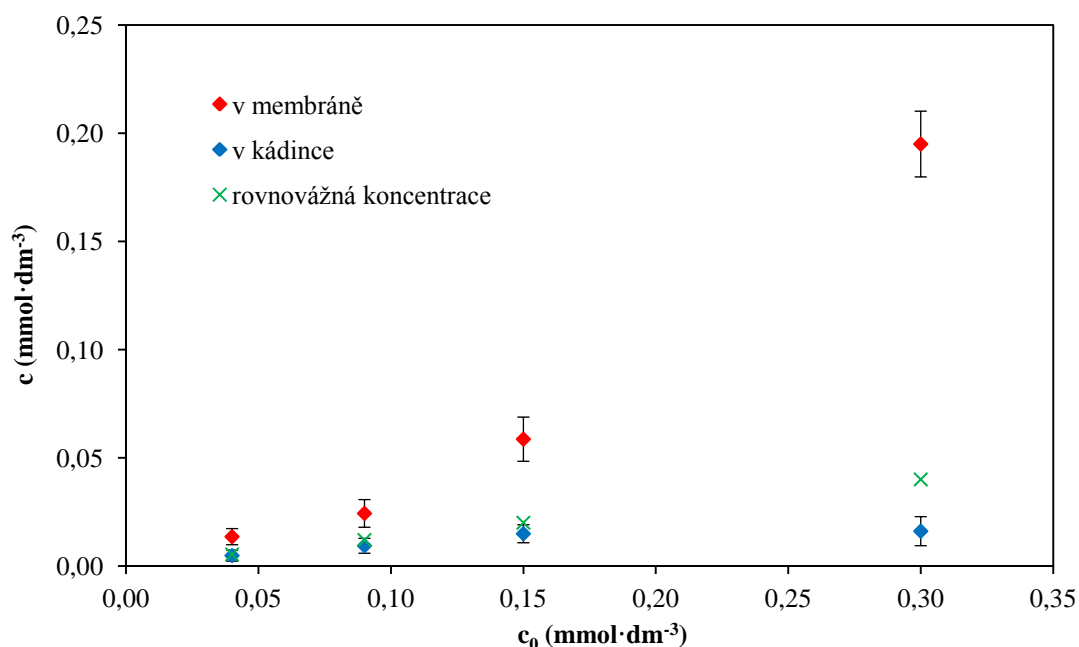
## 5.5.2 Prostředí fyziologické iontové síly

### 5.5.2.1 CTAB

Ve fyziologickém roztoku ( $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl) dochází k tvorbě micel při nižších koncentracích tenzidu. Pro CTAB má kritická micelární koncentrace hodnotu přibližně  $0,062 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  [51]. Pro dialýzu samotného tenzidu byly tedy vybrány koncentrace tenzidu před a za kritickou micelární koncentrací. Opět pro možnost porovnání, zda přítomnost micel má nebo nemá vliv na rychlost prostupu CTAB přes membránu.

Z grafu (obr. 37) je jasné vidět, že po 24 hodinách dialýzy čistého CTAB byly koncentrace retentátu a permeátu velmi rozdílné. To dokazují i vypočtené poměry  $c_r/c_p$  v tabulce (tab. 6), které dosahují vysokých hodnot. V oblasti vyšších koncentrací CTAB, daleko za hodnotou CMC, je přesup látky přes membránu velmi pomalý. Při srovnání poměrů  $c_r/c_p$  roztoku  $c_0=0,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  v prostředí NaCl oproti vodnému prostředí, je tato dialýza téměř pětinasobně pomalejší.

Hodnoty rovnovážných koncentrací jsou jen o málo větší než hodnoty permeátu. Tento výsledek může být vysvětlen jediné chybou při přípravě vzorků.



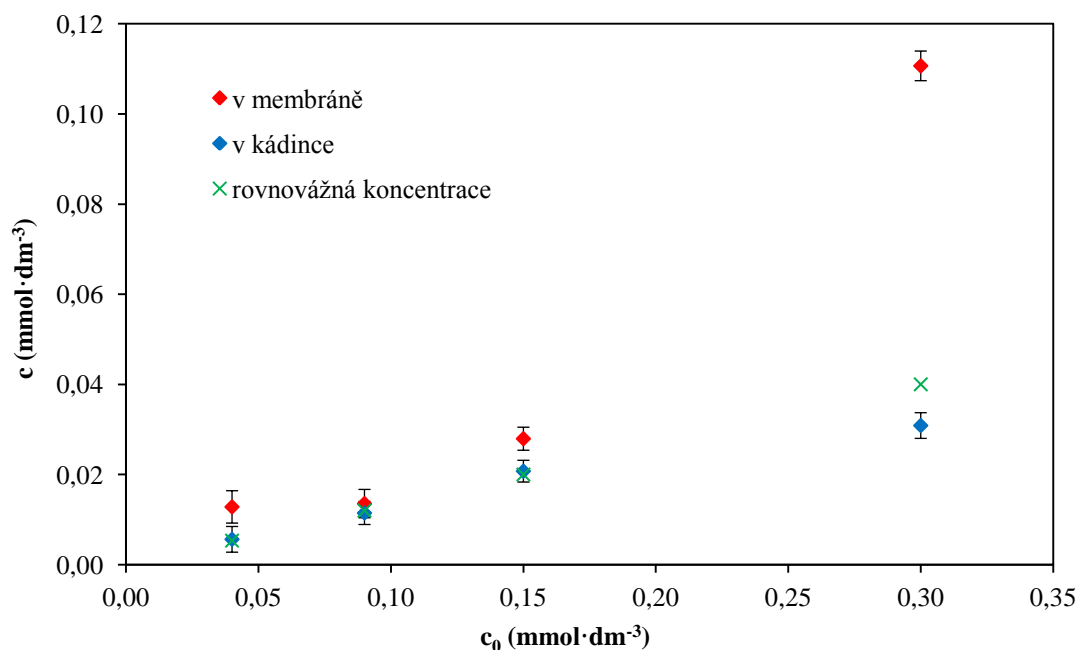
Obr. 37: Dialýza CTAB v NaCl 24 hodin

Tab. 6: Poměry koncentrací  $c_r/c_p$  CTAB v NaCl v daných dobách

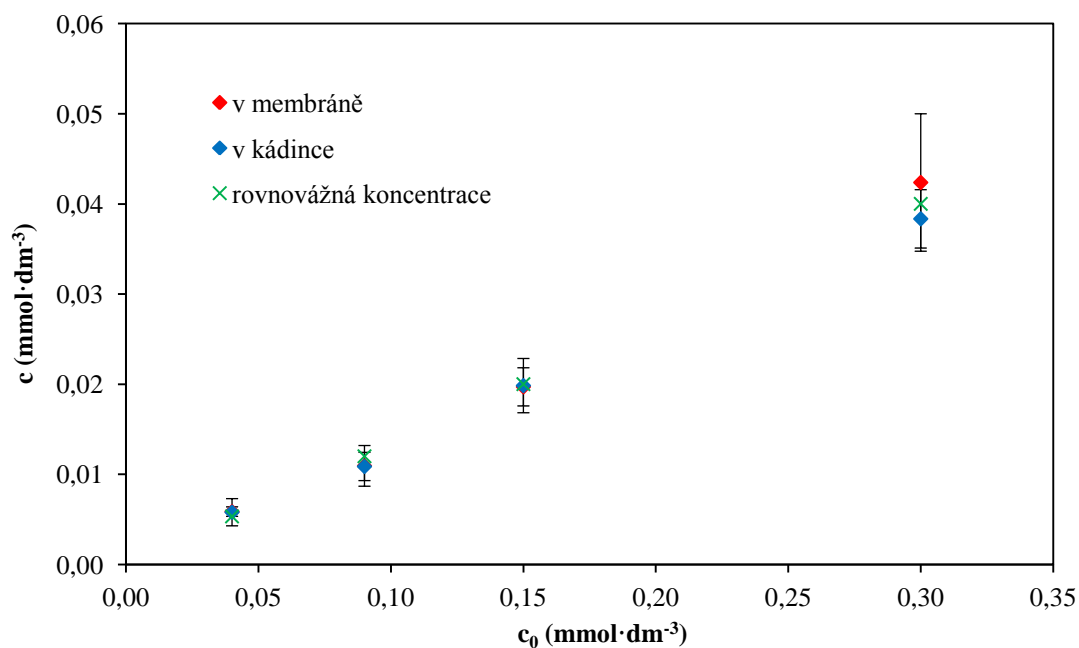
$c_0$ CTAB ( $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	$c_r/c_p$					
	doba dialýzy					
	24 hod		48 hod		120 hod	
	průměr	smodch	průměr	smodch	průměr	smodch
0,04	2,84	0,36	2,02	0,39	1,11	0,02
0,09	2,50	0,17	1,18	0,05	1,04	0,08
0,15	3,93	0,06	1,35	0,01	1,00	0,10
0,3	10,12	0,34	3,59	0,08	1,10	0,12

Obr. 38 zobrazuje konečné koncentrace čistého CTAB po dialýze 48 hodin. Hodnoty uvnitř i vně membrány se začínají vyrovnávat. Většina stanovených hodnot se blíží hodnotám rovnovážné koncentrace. Výjimku tvoří roztok  $c_0=0,3 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , který této koncentraci nedosahuje a navíc má ve srovnání s ostatními vzorky vyšší poměr  $c_r/c_p$  (tab. 6).

Po 120 hodinách dialýzy CTAB v NaCl (obr. 39) došlo u vzorků téměř k úplnému vyrovnání koncentrací retentátu, permeátu a bodů rovnovážné koncentrace. Bylo potvrzeno, že přítomnost membrány není pro systém překážkou a bez problémů může dojít k vyrovnání koncentrací roztoků uvnitř i vně membrány.



Obr. 38: Dialýza CTAB v NaCl 48 hodin



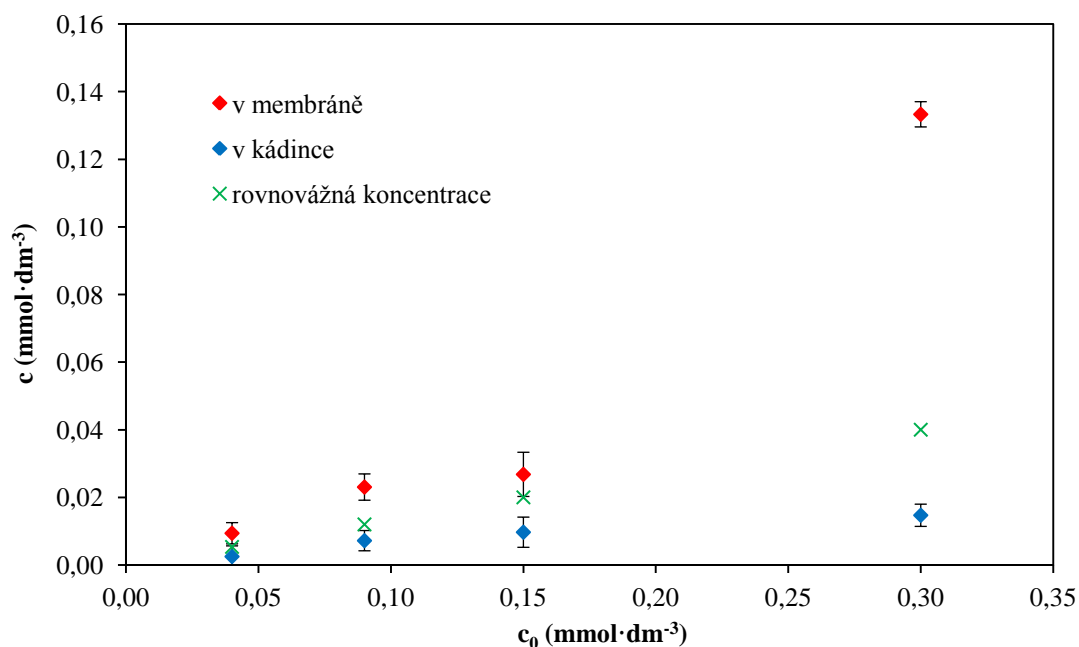
Obr. 39: Dialýza CTAB v NaCl 120 hodin

### 5.5.2.2 CTAB+HyA

Pro experimenty se systémem CTAB+HyA v NaCl byly pro dobré porovnání výsledků dialýzy zvoleny stejné koncentrace tenzidu jako při dialýze čistého CTAB v NaCl a systému CTAB+HyA ve vodném prostředí.

Naměřená data roztoků po dialýze 24 hodin jsou zobrazena v grafu (obr. 40). Ani v tomto systému nedošlo po tak krátké době k vyrovnání koncentrací tenzidu v retentátu a permeátu. Výsledná rovnovážná koncentrace se nachází mezi stanovenými hodnotami CTAB po dialýze. Přítomnost HyA z výsledků zatím není znát. Nejpomalejší přestup látky přes membránu je zaznamenán u počáteční koncentrace tenzidu  $c_0=0,3 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . To dokazují hodnoty poměru  $c_r/c_p$  (tab. 7).

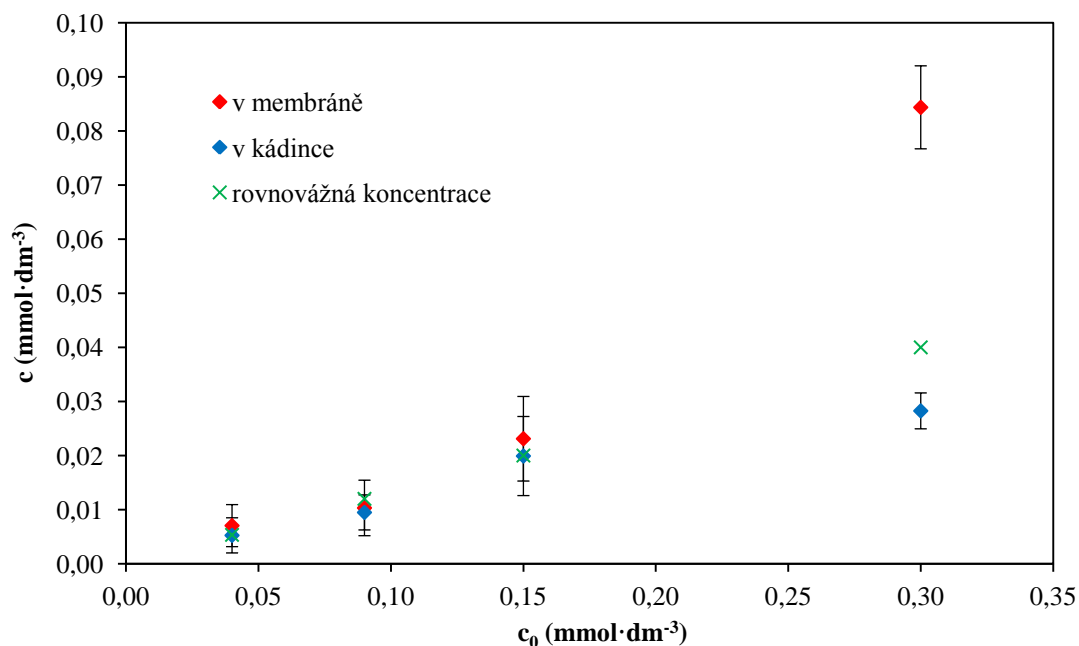
Porovnání rychlostí dialýzy mezi systémy v prostředí NaCl (tab. 6, tab. 7) a i v prostředí  $\text{H}_2\text{O}$  (tab. 5) je velmi složité. Ze získaných poměrů  $c_r/c_p$  se nedá říci, že by byl pro tyto hodnoty zaznamenán nějaký pravidelný trend.



Obr. 40: Dialýza CTAB+ HyA v NaCl 24 hodin

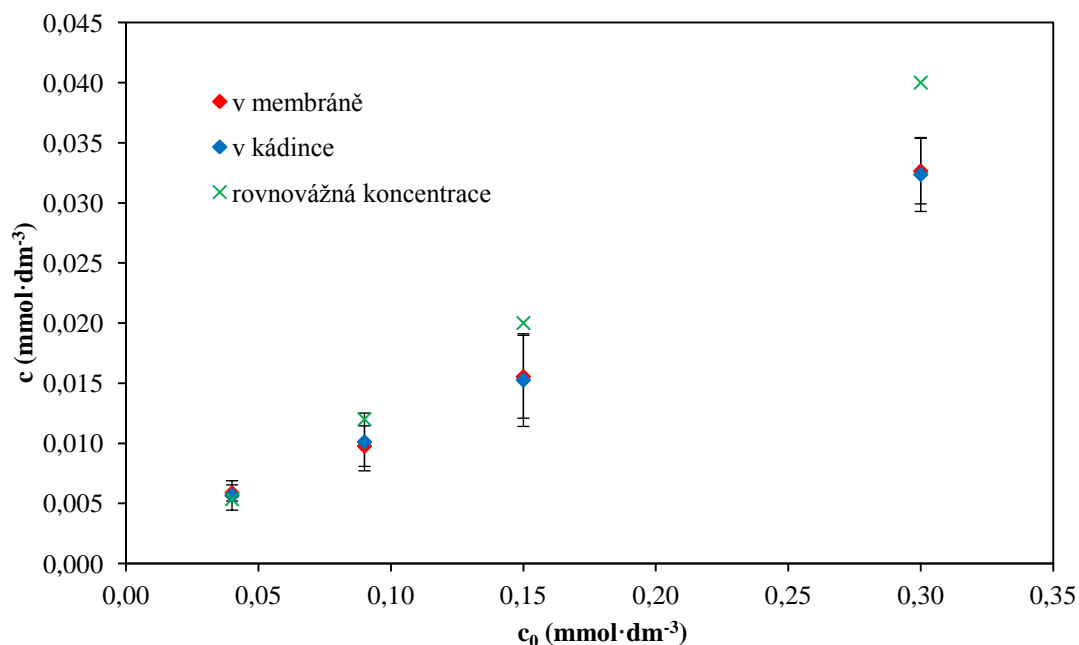
Tab. 7: Poměry koncentrací  $c_r/c_p$  CTAB+HyA v NaCl v daných dobách

$c_0 \text{ CTAB (mmol}\cdot\text{dm}^{-3})$	$c_r/c_p$					
	doba dialýzy					
	24 hod		48 hod		120 hod	
	průměr	smodch	průměr	smodch	průměr	smodch
0,04	4,50	0,86	1,32	0,20	1,07	0,13
0,09	3,23	0,47	1,18	0,21	0,99	0,12
0,15	2,78	0,17	1,16	0,08	1,02	0,04
0,3	9,09	0,64	2,83	0,01	1,00	0,04



Obr. 41: Dialýza CTAB+ HyA v NaCl 48 hodin

Z obrázku (obr. 41) je patrné, že po 48 hodinách dialýzy se koncentrace retentátu a permeátu systému téměř vyrovnaly, kromě vzorků s počáteční koncentrací  $c_0=0,3$  mmol·dm<sup>-3</sup>. Stanovené hodnoty se pohybují v blízkém okolí rovnovážných koncentrací. Při srovnání poměrů  $c_r/c_p$  čistého CTAB a CTAB+HyA v NaCl (tab. 6, tab. 7) má větší rychlost dialýzy systém s přidavkem hyaluronanu.



Obr. 42: Dialýza CTAB+ Hya v NaCl 120 hodin

Po 120 hodinách dialýzy došlo u všech roztoků k jasnému vyrovnání koncentrací CTAB v retentátu i permeátu (obr. 42, tab. 7). Většina výsledných hodnot je oproti rovnovážné koncentraci o dost snížena. To může být opět částečně dáno zadržením tenzidu na povrchu

membrány či kádinky, ale především přítomností hyaluronanu a jeho interakcemi s CTAB (viz kapitola 5.3). Stejně jako ve vodném prostředí dosahují konečné koncentrace vzorků mnohem nižších hodnot, než jsou hodnoty rovnovážných koncentrací roztoků. Tím, že dochází k interakcím mezi CTAB a HyA, je v roztoku sníženo celkové množství volných molekul CTAB, které mohou přecházet přes membránu. Po dialýze probíhající dostatečně dlouhou dobu a tím vyrovnání koncentrací retentátu i permeátu jsou tedy stanovené koncentrace CTAB nižší. Tím jsou dokázány určité interakce a jejich stabilita mezi CTAB a HyA v prostředí fyziologické iontové síly.



## 6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium interakcí hyaluronan-tenzid. Cílem práce bylo zpracovat rešerši na téma interakce polyelektrolytu s tenzidy za využití dialyzační metody. Dále nalézt a ověřit vhodnou analytickou metodu pro stanovení koncentrace tenzidu CTAB v roztocích, navrhnout a provést experimenty studující interakce mezi hyaluronanem a tenzidem pomocí dialýzy a posoudit význam získaných výsledků pro přípravu cílených nosičů biologicky aktivních látek. Jako vhodný polyelektrolyt pro zadaný experiment byl vybrán nativní hyaluronan o jedné molekulové hmotnosti, jako tenzid byl použit cetyltrimethylamonium bromid (CTAB). Studium bylo provedeno ve vodném prostředí a v prostředí fyziologické iontové síly ( $0,15\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl).

Stanovení koncentrace tenzidu CTAB v roztocích bylo založeno na práci Wurster a Werwatganone [46]. Základem této metody je extrakce tenzidu do chloroformového roztoku kyseliny pikrové a následná analýza koncentrace tenzidu ve vzorku pomocí UV-VIS spektroskopie. Kyselina pikrová tvoří s tenzidem žlutý komplex, jehož intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci stanovované látky ve vzorku.

Na počátku práce byly sestaveny a proměřeny kalibrační křivky ve vodném prostředí a v prostředí  $0,15\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl. Obě křivky vykazovaly lineární závislost. V roztoku NaCl strmota kalibrační přímky oproti vodnému prostředí mírně klesla. Pro vyhodnocení prováděných měření byly výsledné hodnoty přepočítávány z rovnice regrese odpovídající měřenému systému.

Dále byla stanovena a ověřena rizika metody stanovení CTAB, především vliv přesné koncentrace kyseliny pikrové v chloroformu, doba extrakce vzorku a objem roztoku kyseliny pikrové. Výsledky ukázaly, že koncentrace kyseliny pikrové v chloroformu nemá na intenzitu zbarvení vzorku vliv. Nejvíce konečné hodnoty absorbancí ovlivní přesný přídavek roztoku kyseliny pikrové. Doba třepání pro extrakci tenzidu do chloroformu byla stanovena na minimální čas 30 až 60 vteřin. V rozmezí tohoto času se výsledné hodnoty absorbancí mění už jen minimálně.

V další části práce byl zkoumán vliv přítomnosti hyaluronanu v roztoku tenzidu. Měření bylo provedeno ve vodném a fyziologickém prostředí při nízkých koncentracích tenzidu, v oblasti tvorby premicelárních útvarů. Experiment ukázal, že v přítomnosti HyA dojde ke snížení výsledných koncentrací CTAB ve vzorku. V roztoku je méně molekul, které mohou tvořit komplexy s kyselinou pikrovou. Tenzid s hyaluronanem tedy interaguje a vykazuje větší afinitu k HyA než ke kyselině pikrové.

Následující experimenty byly provedeny pro ověření interakcí mezi CTAB a hyaluronanem v závislosti na změně koncentrace HyA, opět v prostředí  $\text{H}_2\text{O}$  a NaCl. Pro dané experimenty byly zvoleny nízké koncentrace HyA ( $1, 5$  a  $10\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací hyaluronanu, bez ohledu na charakter prostředí, klesá množství volných molekul CTAB v roztoku.

V poslední části práce byly zkoumány interakce a stabilita systému CTAB+HyA pomocí dialyzační metody. Celkem byly pro experiment připraveny čtyři systémy v oblasti kritické micelární nebo agregační koncentrace, a to roztoky čistého CTAB nebo CTAB s hyaluronanem vždy ve vodném prostředí nebo v prostředí  $0,15\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl.

Při dialýze čistého CTAB, bez ohledu na použité prostředí, došlo po 120 hodinách k vyrovnání koncentrací retentátu a permeátu. Výsledné hodnoty byly téměř u všech vzorků

stejně, jako hodnoty vypočítaných rovnovážných koncentrací při ideálním promísení vzorků. To dokázalo, že přítomnost membrány nemá vliv na výsledky experimentu.

Po dialýze 120 hodin systému CTAB+HyA v prostředí  $H_2O$  i NaCl také došlo k vyrovnání koncentrací retentátu a permeátu. Výsledné hodnoty koncentrací však byly oproti hodnotám rovnovážných koncentrací značně sníženy. Díky interakcím mezi HyA a CTAB bylo v roztoku celkově méně volných molekul tenzidu, které mohly přecházet přes membránu, a tím byly i konečné koncentrace CTAB po dialýze nižší. To ukázalo, že tenzid se na hyaluronan váže dostatečně velkými silami, které minimálně po dobu 120 hodin zabrání rozpadu systému na jednotlivé molekuly ve vodném prostředí i v prostředí fyziologické iontové síly. Systém by tedy díky této stabilitě mohl být vhodný pro přípravu cílených nosičů biologicky aktivních látek.

Na závěr lze potvrdit, že zadané cíle práce byly splněny. Práce především přinesla novou analytickou metodu pro stanovení koncentrace tenzidu v roztoku, která bude využita i pro další studium systému hyaluronan-tenzid.

## 7 LITERATURA

- [1] MEYER, Karl a John W. PALMER. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biology and Chemistry*. 1934, č. 107, s. 629-634.
- [2] FAKHARI, A. a C. BERKLAND. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomaterialia*. 2013, roč. 9, č. 7, s. 7081-7092.
- [3] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Glycoforum.gr.jp. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. 2007 [cit. 2013-12-13]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#VIII>
- [4] COWMAN, M.K. a S. MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 2005, č. 340, s. 791-809.
- [5] GARG, H.G. a Ch.A. HALES. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. UK: Elsevier, 2004. ISBN 0080443826.7
- [6] BOERIU, Carmen G. et al.. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013, č. 2013.
- [7] SCHRAMM, L. L., STASIUK, E. N. and MARANGONI, D. G. Surfactants and their applications. *Annual Reports: Section C: Physical Chemistry* [online]. 5. 6. 2003, vol. 2003, Issue 0, pp. 3 - 48 [cit. 2012-11-14]. DOI: 10.1039/B208499F. Dostupné z: <http://www.scribd.com/doc/109635300/Surfactants-and-Their-Applications>
- [8] Pouchlý Julius: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3rd ed. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6
- [9] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5th ed. Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-579-X.
- [10] Surfactants. *Www.sciencelearn.org.nz* [online]. 2012 [cit. 2014-02-01]. Dostupné z: <http://www.sciencelearn.org.nz/Science-Stories/Where-Land-Meets-Sea/Sci-Media/Images/Surfactants>
- [11] Rosen, M. J.: *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2004. 444 p. ISBN 0-471-47818-0.
- [12] MACHAŇOVÁ, Dagmar. POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY. *Www.ft.tul.cz* [online]. 2013 [cit. 2014-02-03]. Dostupné z: <http://www.ft.tul.cz/depart/ktm/files/20130311/TCH-%C3%BAloha3-Povrchov%C4%9B%20aktivn%C3%AD%20l%C3%A1tky.pdf>
- [13] HOLMBERG, K, B JONSSON a KRONBERG. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2003, 545 s. ISBN 04-714-9883-1.
- [14] LINFIELD, W. M. *Anionic surfactants*. New York: Marcel Dekker Inc, 1976. ISBN 0824761588.
- [15] Cetyltrimethylammonium bromide. *Www.mpbio.com* [online]. 2014 [cit. 2014-02-04]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02195029>
- [16] Bareš, M., Zajíc, J.: *Chemie a technologie tensidů a detergentů*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1982. s. 270. ISBN 440-3332.
- [17] JUNGEMANN, E. *Cationic Surfactants*. New York: Marcel Dekker Inc, 1970. ISBN 0824713400.

- [18] BORUAH, Bornali at al.. Partition equilibrium of phenol red in aqueous polymer–surfactant system: Determination of critical aggregation concentration. *Journal of Molecular Liquids*. 2010, roč. 151, č.
- [19] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [20] NOVOTNÁ, Radka, Tomáš ŠILHA a Zdeněk TRÁVNÍČEK. *Spektrální metody studia chemických látek*. Olomouc, 2011. Učební text. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [21] *Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti* [online]. 2008 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: [web.vscht.cz/koplikr/UV\\_VIS\\_spektrometrie.pdf](http://web.vscht.cz/koplikr/UV_VIS_spektrometrie.pdf)
- [22] *UV-VIS Absorption Spectroscopy* [online]. 2010 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/uvvisab1.htm>
- [23] *UV-VIS Absorption spectroscopy* [online]. 2012 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: [http://www.phys.ubbcluj.ro/~dana.maniu/OS/BS\\_7.pdf](http://www.phys.ubbcluj.ro/~dana.maniu/OS/BS_7.pdf)
- [24] *Uv-Visible Spectroscopy* [online]. c2005 - 2006 [cit. 2010-02-28]. Dostupné z: <http://www.bookrags.com/research/uv-visible-spectroscopy-wop/>
- [25] KOMÍNKOVÁ, Jana, MESTEK, Oto. *Atomová absorpční spektrometrie*. [Www.vscht.cz](http://www.vscht.cz) [online]. 2008 [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf>
- [26] SINICA, Alla. *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra*. [Www.vscht.cz](http://www.vscht.cz) [online]. 2006 [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/anl/lach1/5\\_Foto.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf)
- [27] HOFMANN, Klaus. *Enzymes and Metabolites in Picric Acid (2,4,6-Trinitrophenol) and 2,4-Dinitrophenol Biodegradation*. Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, 2003. Dissertation-Master. Universität Stuttgart.
- [28] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: VŠCHT Praha, 2006. ISBN 80-7080-586-2.
- [29] ŠNITA, D.. *Chemické inženýrství I*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: VŠCHT Praha, 2006. ISBN 80-7080-589-7.
- [30] RAGAZZON, Patricia A. et al.. Competition dialysis: A method for the study of structural selective nucleic acid binding. *Methods*. 2007, roč. 42, č. 2.
- [31] HANEY, Paul, Katherine HERTING a Suzanne SMITH. Separation characteristics of dialysis membranes. [Www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) [online]. 2013 [cit. 2014-03-01]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/previews/2013-articles/separation-characteristics-dialysis-membranes/>
- [32] Dialysis Methods for Protein Research. [Www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) [online]. 2014 [cit. 2014-03-01]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/method/dialysis-methods-protein-research#procedure>
- [33] HASAL, P., SCHREIBER, I., et al. *Chemické inženýrství I*. 2. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: VŠCHT Praha, 2007. ISBN 978-80-7080-002-7.
- [34] YU-JIN, Jin. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2010, roč. 40, 33-43.

- [35] CULTY, M. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. *Journal of cellular physiology*. 1994, ROČ. 160, č. 2.
- [36] AKIMA, K. Evaluation of antitumor activities of hyaluronate binding antitumor drugs: synthesis, characterization and antitumor activity. *Journal of Drug Targeting*. 1996, roč. 4, č. 1.
- [37] MAEDA, Hiroshi. Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo. *Bioconjugate Chemistry*. 1992, roč. 3, č. 5.
- [38] ELIAZ, R. a F. SZOKA Jr.. Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells. *Cancer research*. 2001, roč. 61, č. 6.
- [39] CHOI, K.Y. et al.. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials*. 2010, roč. 31, č. 1.
- [40] UPADHYAY, K.K. The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly(gamma-benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials*. 2010, roč. 31, č. 10.
- [41] OYARZUN-AMPUERO, Felipe A. et al. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, roč. 49, č. 4, 483–490.
- [42] YANG, Xiao-yan et. al. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. *Cancer Letters*. 2013, roč. 334, č. 2, s. 338-345.
- [43] BARBAULT-FOUCHER, S. Design of poly-ε-caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery. *Journal of Controlled Release*. 2008, roč. 83, č. 3, 365–375.
- [44] LIU, Yanhua. Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, roč. 421, č. 1, s. 160-169.
- [45] GUO, Wen et al.. Use of polyelectrolyte-surfactant complexes in colloid-enhanced ultrafiltration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1997, 123-124, s. 695-703
- [46] WURSTER, Dale Eric a Pornpen WERAWATGANONE. Influence of the Polymer–Micelle Interaction on Micelle–Substrate Binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, roč. 99, č. 3, 1440–1451
- [47] JONES, Marie-Christine a Jean-Christophe LEROUX. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. [online]. 1999, roč. 48, č. 2, s. 101-111 [cit. 2013-12-16].
- [48] ZAMBITO, Y. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?—A case study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, roč. 434, 1-2.
- [49] VARGHESE, Susheel John. In vitro interaction study of retinoic acid isomers with telmisartan and amlodipine by equilibrium dialysis method using UV spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011, roč. 79, č. 2.
- [50] ŠEJNOHOVÁ, M. *Agregační procesy v systémech amfifilní látka-polymer*. Brno, 2012. 40 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.

- [51] HALASOVÁ, T. *Interakce a agregace v systémech hyaluronan-aminokyselinytenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 60 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [52] KOTOUČEK, M., J. SKOPALOVÁ a P. ADAMOVSÝ. 4. HODNOCENÍ ANALYTICKÝCH VÝSLEDKŮ. *Http://ach.upol.cz/cs/* [online]. 2013 [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: *http://ach.upol.cz/ucebnice/hodnoceni7.htm#pr4.21*

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BKC – benzalkonium chlorid  
CMC – kritická micelární koncentrace  
CAC – kritická agregační koncentrace  
CTAB – cetyltrimethylamonium bromid  
Da – dalton  
DLS – dynamický rozptyl světla  
DMF – dimethylforamid  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
DOX – doxorubicin  
DSC – diferenční skenovací kalorimetrie  
HPMC – hydroxypropylmethyl celuloza  
HA – kyselina hyaluronová  
Hya – hyaluronan  
MWCO – Molecular Weight Cut Off  
NLC – nanostrukturované lipidové nosiče  
PAL – povrchově aktivní látka  
PCL – poly- $\epsilon$ -kaprolaktan  
PDMDAAC – poly(dimethyldiallylammonium chlorid  
PEO-PBLA – poly(ethylen oxid)-poly(beta-benzyl L-aspartát)  
PTX – paclitaxel  
SDS – dodecyl sulfát sodný  
TEM - transmisní elektronová mikroskopie  
tzv. – takzvaný  
UDP – Uridindifosfátglukóza  
UV-VIS – ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra

## 9 PŘÍLOHY

### 9.1 Podrobný postup stanovení CTAB

Veškerou práci vždy provádět v rukavicích, s ochrannými brýlemi a v digestoři.

#### 9.1.1 Příprava zásobního roztoku 0,01% kyseliny pikrové v chloroformu

##### 9.1.1.1 Použité chemikálie, přístroje a nádoby

kyselina pikrová, chloroform, analytické váhy, špachtle, zásobní lahev s uzávěrem ( $V=100\text{ cm}^3$ ), odměrný válec ( $V=100\text{ cm}^3$ )

##### 9.1.1.2 Postup

- 1) Do zcela suché zásobní lahve navážít určité množství (0,015–0,025 g) kyseliny pikrové. Pro danou zásobní lahev nesmí navážka přesáhnout 0,03 g  $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ , aby bylo možné přidat odpovídající množství chloroformu. Odběr navážky provést z co nejspodnější části zásobní nádoby s kyselinou pikrovou, aby nebyl navážen pouze vodný roztok. Obsah zásobní nádoby se musí udržovat stále vlhký (obsah vody min. 10 %). U kyseliny pikrové v suchém stavu hrozí nebezpečí exploze. Výbuch nastává při úderu, tření, ohni nebo při působení jiných zdrojů zapálení.
- 2) Doplnit navážku kyseliny pikrové chloroformem pomocí odměrného válce o  $V=100\text{ cm}^3$ . Dle provedeného výpočtu odpovídá navážce v gramech 4361,75násobek chloroformu v  $\text{cm}^3$ . Výsledný roztok dobře uzavřít, promíchat a pro úschovu po delší dobu opatřit parafilmem.

#### 9.1.2 Převedení vzorků do chloroformu

##### 9.1.2.1 Použité nádoby

zkumavka ( $V=20\text{ cm}^3$ ) se zátkou, teflonová páska, vialka s uzávěrem, automatická pipeta ( $V=5\text{ cm}^3$ ), skleněná pipeta ( $V=5\text{ cm}^3$ ), balónek, stojan, kruh, nálevka, kulatý filtrační papír, odpadní kádinka a vialka, kádinka pro postavení zkumavky

##### 9.1.2.2 Postup

- 1) Do zcela suché zkumavky napipetovat pomocí automatické pipety  $4\text{ cm}^3$  analyzovaného vzorku s CTAB a následně automatickou pipetou připipetovat  $8\text{ cm}^3$  0,01% roztoku kyseliny pikrové v chloroformu. Tedy poměr vzorek:kyselina pikrová 1:2 (objemově).  
Pozn. Roztok chloroformu pipetovat rychle, těká a na přesném objemu dost záleží!
- 2) Zkumavku ihned uzavřít zátkou opatřenou teflonovou páskou.
- 3) Zkumavku velmi intenzivně třepat minimálně 1 minutu. Při třepání nutno jistit zátku.
- 4) Zkumavku ponechat 2 minuty v klidu, pro dobrou separaci fází.
- 5) Pomocí skleněné pipety odpipetovat horní (vodnou) fázi.  
Pozn. Snažit se odpipetovat co nejvíce vodné fáze, ale nelze odebrat úplně vše, naštěstí zbytek následně zůstane na filtračním papíře.
- 6) Provést filtraci zbylého roztoku ve zkumavce přes filtrační papír za normálního tlaku. První 1-2  $\text{cm}^3$  roztoku filtrovat do odpadní vialky, následuje rychlá výměna čistou suchou označenou vialkou pro konečný vzorek.
- 7) Vialku dobře uzavřít a vzorek co nejdříve proměřit na UV-VIS spektrofotometru (rozsah vlnových délek 300–700 nm), aby nedošlo k zakoncentrování vzorku odtékáním chloroformu.